

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

EFECTOS DE LA INFECCIÓN CON EL
VIRUS HERPES SIMPLEX DE TIPO 1 EN
CÉLULAS NEURONALES Y SU RELACIÓN
CON LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

SORAYA SANTANA MARTÍNEZ

MAYO, 2010

Memoria presentada por
SORAYA SANTANA MARTÍNEZ
para aspirar al Grado de
DOCTORA EN BIOQUÍMICA
(BIOLOGÍA MOLECULAR)

Directores de esta Tesis:

JESÚS ALDUDO SOTO

Doctor en Ciencias Biológicas
y

FERNANDO VALDIVIESO AMATE

Catedrático de Bioquímica y
Biología Molecular

Madrid, Mayo 2010

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Biología Molecular/Centro de Biología Molecular (CSIC-UAM), gracias a una beca financiada por la Fundación Ramón Areces.



A mi madre

ABREVIATURAS

3-MA	3-metiladenina
A β	péptido β -amiloide
A β 40	péptido β -amiloide (1-40)
A β 42	péptido β -amiloide (1-42)
ADAM	Metaloproteasa de la Familia de las Desintegrinas
AICD	Dominio Intracelular de la proteína APP
ApoE	Apolipoproteína E
ApoE2/E3/E4	Isoforma E2, E3 y E4 de la Apolipoproteína E
<i>APOE</i>	Gen de la Apolipoproteína E
APOE- ϵ 2/ ϵ 3/ ϵ 4	Alelos 2, 3 y 4 del gen de la Apolipoproteína E
<i>APP</i>	Gen de la Proteína precursora del péptidos β -amiloide
APP	Proteína precursora del péptidos β -amiloide
APLP 1/2	Proteínas similares al APP
APS	Persulfato amónico
ATCC	American Type Culture Collection (Colección Americana de Cultivos Tipo)
<i>ATG</i>	Gen relacionado con la autofagia
Atg	Proteína relacionada con la autofagia
BACE	Proteasa que corta en el sitio β de la Proteína APP o β -secretasa
BACE 1	Proteasa que corta en el sitio β de la Proteína APP o β -secretasa 1
BACE 2	Proteasa que corta en el sitio β de la Proteína APP o β -secretasa 2
BSA	Albúmina de Suero Bovina
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementario
CHX	Cicloheximida
C-terminal	Extremo Carboxilo Terminal
DAPI	Dihidrocloreuro de 4', 6-Diamidino-2-fenilindol
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	Medio Esencial Mínimo modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EA	Enfermedad de Alzheimer
EBBS	Solución salina balanceada de Earle
ECE 1	Enzima degradadora de la endotelina 1
ECE 2	Enzima degradadora de la endotelina 2
EDTA	Ácido Etilen-Diamino-Tetracético
EEA1	Antígeno endosomal temprano 1

eIF2- α	Factor de iniciación de la traducción 2 α
ELISA	Inmunoensayo Ligado a Enzima
FCS	Suero Fetal de Ternera
Genes IE	Genes virales Inmediatamente Tempranos
Genes E	Genes virales Tempranos
Genes L	Genes virales Tardíos
Genes UL	Genes virales de la Región Única Larga
Genes US	Genes virales de la Región Única Corta
GFP	Proteína verde fluorescente
GLuc	Luciferasa de <i>Gaussia princeps</i>
HCF-1	Factor celular del huésped 1
HHV-6	Herpesvirus humano 6
h.p.i	Horas postinfección
HSV-1	Herpes Simplex Virus Tipo 1
HVEM	Receptor mediador de la entrada de HSV-1
ICP	Proteína Viral de Células Infectadas
iNOS	Enzima óxido nítrico sintasa inducible
iRNA	RNA interferente
kb	kilobase
kDa	kilodalton
LAT	Transcrito Asociado a Latencia
LC3	Cadena ligera 3 de la proteína 1 asociada a microtúbulos
LC3-I/II	Isoformas de la proteína LC3
LRP	Proteína relacionada con los receptores de baja densidad
MEM	Medio Esencial Mínimo de Eagle
MHC I	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase I
moi	Multiplicidad de Infección
mRNA	Ácido Ribonucleico mensajero
MVB	Cuerpo multivesicular
NMDA	N-metil-D-aspartato
NP-40	Nonidet P-40
N-terminal	Extremo Amino Terminal
PAA	Ácido fosfonoacético
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PHF	Filamentos Helicoidales Apareados

PILR α	Receptor similar a la inmunoglobulina pareado tipo 2
PKR	Proteína quinasa dependiente de RNA de doble cadena
PP1 α	Proteína fosfatasa 1 α
<i>PS1/PS2</i>	Gen de la Presenilina 1/Presenilina 2
PS1/PS2	Proteína Presenilina 1/ Presenilina 2
PVDF	Difluoruro de Polivinilideno
RAGE	Receptores de productos terminales de glicación avanzada
RE	Retículo endoplásmico
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT-PCR	Transcripción reversa seguida de PCR
sAPP	APP soluble
sAPP α	APP soluble α
sAPP β	APP soluble β
SDS	Sulfato Sódico de Dodecilo
TACE	Enzima Convertasa del Factor de Necrosis Tumoral α
TAP	Transportador asociado al procesamiento de antígenos
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N, N, N', N'- Tetrametiletilendiamina
TK	Proteína Viral Timidina Kinasa
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
ufp	Unidad formadora de placa
VP	Proteína Viral
VRC	Compartimento de Replicación Viral
WB	Western Blot
XXO	Xantina/Xantina oxidasa

ÍNDICE

ÍNDICE

1. SUMMARY	3
2. INTRODUCCIÓN	7
2.1. LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	7
2.1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES	7
2.1.2. LA PROTEÍNA APP: FUNCIÓN, PROCESAMIENTO Y GENERACIÓN DEL PÉPTIDO A β	8
2.1.3. EL PÉPTIDO A β INTRACELULAR	11
2.1.4. LA AUTOFAGIA EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	13
2.1.4.1. Aspectos generales de la autofagia	13
2.1.4.2. Implicación de la autofagia en la enfermedad de Alzheimer	16
2.1.5. EL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	17
2.1.6. HIPÓTESIS INFECCIOSA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	18
2.2. EL VIRUS <i>HERPES SIMPLEX</i> TIPO 1	19
2.2.1. ASPECTOS GENERALES	19
2.2.2. HSV-1 EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	22
2.2.3. HSV-1 Y LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	24
2.2.4. HSV-1 Y LA AUTOFAGIA	25
2.2.5. HSV-1 Y EL ESTRÉS OXIDATIVO	26
3. OBJETIVOS	31
4. MATERIALES Y MÉTODOS	35
4.1. REACTIVOS	35
4.2. SONDAS FLUORESCENTES	35
4.3. ANTICUERPOS	36
4.3.1. ANTICUERPOS UTILIZADOS EN LA CARACTERIZACIÓN DE LA INFECCIÓN	36

4.3.2. ANTICUERPOS UTILIZADOS EN LA CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO AUTOFÁGICO	36
4.3.3. ANTICUERPOS QUE RECONOCEN LA PROTEÍNA APP Y EL PÉPTIDO A β	36
4.3.4. OTROS ANTICUERPOS.....	37
4.3.5. ANTICUERPOS SECUNDARIOS.....	38
4.4. MÉTODOS DE TRANSFECCIÓN.....	39
4.4.1. PRECIPITACIÓN CON FOSFATO CÁLCICO.....	39
4.4.2. LIPOFECTAMINA.....	39
4.4.3. NUCLEOFECIÓN.....	39
4.5 LÍNEAS CELULARES.....	40
4.6. GENERACIÓN DE HERRAMIENTAS PARA LA MONITORIZACIÓN DE LA AUTOFAGIA	41
4.6.1. GENERACIÓN DE UNA LÍNEA CELULAR ESTABLEMENTE TRANSFECTADA QUE EXPRESA LA PROTEÍNA DE FUSIÓN GFP-LC3.....	41
4.6.2. GENERACIÓN DE UN ADENOVIRUS QUE EXPRESA UN RNA INTERFERENTE ESPECÍFICO DE <i>ATG5</i> HUMANO.....	41
4.7. VIRUS E INFECCIÓN.....	42
4.7.1. INFECCIÓN CON HSV-1.....	42
4.7.2. TITULACIÓN DE MUESTRAS INFECTADAS.....	42
4.8. TRATAMIENTOS.....	43
4.9. PREPARACIÓN DE MUESTRAS CELULARES.....	44
4.9.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS TOTALES DE PROTEÍNAS.....	44
4.9.2. MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS.....	44
4.9.3. OBTENCIÓN DE MEDIOS CONDICIONADOS DE LOS CULTIVOS CELULARES	45
4.10. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS.....	45
4.10.1. INMUNOMARCADO DESPUÉS DE ELECTROTRANSFERENCIA PROTEICA (WESTERN-BLOT).....	45

4.10.1.1. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE).....	45
4.10.1.2. Electrotransferencia proteica.....	45
4.10.1.3. Inmunodetección y revelado.....	46
4.10.2. INMUNOCITOQUÍMICA.....	46
4.10.3. ENSAYO ELISA PARA CUANTIFICACIÓN DEL PÉPTIDO A β SECRETADO E INTRACELULAR.....	47
4.11. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	47
4.12. ENSAYO DE ACTIVIDADES α -, β -, Y γ -SECRETASAS.....	48
4.13. ENSAYO DE DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS DE VIDA MEDIA LARGA.....	48
4.14. ENSAYO DE SECRECIÓN DE PROTEÍNAS.....	48
4.15. CUANTIFICACIÓN DE DNA MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	49
4.15.1. EXTRACCIÓN DE DNA.....	49
4.15.2. CUANTIFICACIÓN DE DNA VIRAL.....	49
4.16. CUANTIFICACIÓN DE RNA MENSAJERO POR TRANSCRIPCIÓN REVERSA SEGUIDA DE PCR (RT-PCR) CUANTITATIVA.....	50
4.16.1. AISLAMIENTO DE RNA TOTAL.....	50
4.16.2. RT-PCR CUANTITATIVA.....	50
4.17. ENSAYO DE SILENCIAMIENTO GÉNICO.....	51
4.18. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	51
5. RESULTADOS.....	55
5.1. HSV-1 INDUCE UNA RESPUESTA AUTOFÁGICA INCOMPLETA EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANO.....	55
5.1.1. GENERACIÓN DE HERRAMIENTAS PARA EL ESTUDIO DEL PROCESO AUTOFÁGICO	55
5.1.1.1. Generación y caracterización de líneas establemente transfectadas que expresan la proteína de fusión GFP-LC3.....	55

5.1.1.2. Generación de un adenovirus que expresa un RNA interferente específico de ATG5 humano (Ad-shATG5).....	57
5.1.2. INDUCCIÓN DE UN PROCESO AUTOFÁGICO EN CÉLULAS SK-LC3.....	60
5.1.3. INDUCCIÓN DE UN PROCESO AUTOFÁGICO EN CÉLULAS SK-N-MC.....	64
5.1.4. HSV-1 INDUCE UNA RESPUESTA AUTOFÁGICA IMCOMPLETA.....	68
5.1.4.1. Efecto de los inhibidores lisosomales sobre GFP-LC3 y LC3 endógeno.....	68
5.1.4.2. Análisis por inmunofluorescencia de la proteína p62.....	70
5.1.4.3. HSV-1 no aumenta la degradación autofágica de proteínas.....	72
5.1.4.4. Colocalización del marcador de autofagia LC3 con marcadores lisosomales/endosomales.....	73
5.1.4.5. Monitorización de vesículas autofágicas mediante microscopía electrónica ..	77
5.1.4.6. Colocalización de la proteína LC3 endógena y la glicoproteína gC de HSV-1.....	79
5.1.5. HSV-1 INDUCE UNA ACUMULACIÓN DE AUTOFAGOSOMAS EN CÉLULAS NO NEURONALES.....	80
5.1.6. LA INHIBICIÓN DE LA AUTOFAGIA NO AFECTA A LA EFICIENCIA DE LA INFECCIÓN CON HSV-1.....	83
5.2. LA INFECCIÓN CON HSV-1 ALTERA EL PROCESAMIENTO DE APP CAUSANDO LA ACUMULACIÓN DEL PÉPTIDO Aβ INTRACELULAR.....	85
5.2.1. HSV-1 INDUCE UN AUMENTO DE LOS NIVELES DEL PÉPTIDO Aβ INTRACELULAR.....	85
5.2.2. HSV-1 INDUCE UNA DISMINUCIÓN DE LOS NIVELES DEL PÉPTIDO Aβ SECRETADO.....	90
5.2.3. HSV-1 CAUSA UNA DISMINUCIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA VÍA DE PROCESAMIENTO NO AMILOIDOGÉNICA DE APP.....	93
5.2.3.1. La infección con HSV-1 reduce la actividad α-secretasa.....	93
5.2.3.2. La infección con HSV-1 disminuye los niveles de los fragmentos proteolíticos sAPPα y α-CTF del APP.....	94
5.3. IMPLICACIÓN DEL PROCESO AUTOFÁGICO EN LA ACUMULACIÓN DEL PÉPTIDO Aβ INDUCIDA POR HSV-1.....	98

5.3.1. ESTUDIO DE LA ACUMULACIÓN DE AUTOFAGOSOMAS INDUCIDA POR LA INFECCIÓN CON HSV-1 EN LAS CÉLULAS SK-APP.....	98
5.3.1.1. HSV-1 induce la acumulación de vesículas autofágicas en las células SK-APP	98
5.3.1.2. El péptido Aβ se localiza en vesículas autofágicas en células SK-APP transfectadas con GFP-LC3.....	100
5.3.1.3. El péptido Aβ colocaliza con LC3 endógeno en las células SK-APP.....	101
5.3.1.4. La acumulación de vesículas autofágicas y del péptido Aβ intracelular es específica de la infección por HSV-1.....	102
5.3.2. EL PÉPTIDO Aβ Y LA PROTEÍNA LC3 NO SE LOCALIZAN EN EL COMPARTIMENTO LISOSOMAL DE CÉLULAS SK-APP INFECTADAS CON HSV-1	104
5.3.3. EL PÉPTIDO Aβ COLOCALIZA CON MARCADORES DE ENDOSOMAS TARDÍOS	106
5.3.4. LA AUTOFAGIA NO ESTÁ IMPLICADA EN LA MODIFICACIÓN DE LOS NIVELES DEL PÉPTIDO Aβ INDUCIDA POR HSV-1.....	108
5.4. EFECTOS DE LA INTERACCIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA INFECCIÓN CON HSV-1 SOBRE LOS MARCADORES DE NEURODEGENERACIÓN EN LOS MODELOS CELULARES DE INFECCIÓN.....	111
5.4.1. EL ESTRÉS OXIDATIVO INHIBE LA INFECCIÓN CON HSV-1 EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA.....	111
5.4.2. EFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO SOBRE MARCADORES DE NEURODEGENERACIÓN EN CÉLULAS INFECTADAS CON HSV-1.....	114
5.4.2.1. El estrés oxidativo incrementa la acumulación de autofagosomas inducida por la infección con HSV-1.....	114
5.4.2.2. El estrés oxidativo modifica el procesamiento de APP inducido por la infección con HSV-1.....	116
6. DISCUSIÓN.....	123
6.1. HIPÓTESIS INFECCIOSA DE LA EA. IMPLICACIÓN DEL HSV-1.....	123
6.2. INDUCCIÓN DE UNA RESPUESTA AUTOFÁGICA INCOMPLETA POR HSV-1	125

6.3. ALTERACIÓN DEL PROCESAMIENTO DE LA PROTEÍNA APP POR HSV-1	129
6.4. INTERACCIÓN ENTRE EL HSV-1 Y EL ESTRÉS OXIDATIVO.....	137
7. CONCLUSIONES.....	143
8. BIBLIOGRAFÍA.....	149

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1. Esquema del procesamiento de la proteína APP.....	11
Figura I.2. Aspectos morfológicos del proceso autofágico.....	14
Figura 1. Detección de vesículas autofágicas en la línea celular SK-LC3.....	56
Figura 2. Silenciamiento de la expresión de GFP-Atg5 con shATG5.....	58
Figura 3. Inhibición de la expresión de <i>ATG5</i> endógeno con Ad-shATG5.....	59
Figura 4. Silenciamiento del gen de la <i>lamina A/C</i> con Ad-shLAM.....	59
Figura 5. HSV-1 induce la acumulación de vesículas autofágicas en las células SK-LC3.....	61
Figura 6. HSV-1 induce la acumulación de LC3-II de una forma dependiente del tiempo de infección	61
Figura 7. La inhibición de la infección con HSV-1 bloquea la acumulación de vesículas autofágicas.....	62
Figura 8. Efecto de la cicloheximida sobre la acumulación de GFP-LC3-II en células SK-LC3 infectadas con HSV-1	63
Figura 9. Ad-shATG5 inhibe la acumulación de LC3-II inducida por HSV-1.....	64
Figura 10. HSV-1 induce la acumulación de la proteína LC3-II endógena en las células SK-NM-C.....	65
Figura 11. Efecto de los inhibidores virales sobre la acumulación de LC3-II endógeno en las células SK-NM-C.....	66
Figura 12. La cicloheximida inhibe la acumulación de LC3-II inducida por HSV-1.....	67
Figura 13. Inhibidores de autofagia reducen la acumulación de LC3-II inducida por la infección con HSV-1.....	67
Figura 14. Efecto de los inhibidores lisosomales sobre los niveles de GFP-LC3 en células SK-LC3 infectadas con HSV-1.....	69
Figura 15. Efecto de los inhibidores lisosomales sobre los niveles de LC3 endógeno en células SK-N-MC infectadas con HSV-1.....	70
Figura 16. Acumulación de p62 en células SK-N-MC infectadas con HSV-1.....	71
Figura 17. Colocalización de LC3 y p62 en células SK-N-MC infectadas con HSV-1.....	72

Figura 18. HSV-1 no aumenta la degradación de proteínas de vida media larga en las células SK-N-MC	73
Figura 19. La proteína LC3 no colocaliza con CD63 en las células SK-N-MC infectadas con HSV-1.....	74
Figura 20. La proteína LC3 endógena no colocaliza con el marcador de endosomas tempranos EEA1.....	75
Figura 21. Colocalización de la proteína LC3 endógena con CD222 en células SK-N-MC...	76
Figura 22. Análisis mediante microscopía electrónica de células SK-N-MC infectadas con HSV-1.....	78
Figura 23. Las proteínas gC y LC3 se acumulan en la misma estructura subcelular durante la infección con HSV-1.....	79
Figura 24. HSV-1 induce la acumulación de vesículas autofágicas en células no neuronales	80
Figura 25. Efecto de los inhibidores virales sobre la acumulación de LC3-II en las células HEK 293 A y Hela infectadas con HSV-1	81
Figura 26. La proteína LC3 no colocaliza con CD63 en las células HEK 293 A y Hela infectadas con HSV-1.....	82
Figura 27. El silenciamiento del gen <i>ATG5</i> no afecta a la eficiencia de la infección con HSV-1... ..	83
Figura 28. El silenciamiento de <i>ATG5</i> no afecta a la replicación de HSV-1.....	84
Figura 29. HSV-1 induce un aumento de los niveles del péptido A β intracelular en las células SK-APP.....	86
Figura 30. HSV-1 induce la acumulación del péptido A β intracelular.....	86
Figura 31. El péptido A β se acumula en las células infectadas con HSV-1.....	87
Figura 32. Análisis de los niveles de A β a diferentes tiempos de infección.....	87
Figura 33. Efecto de la inhibición de la infección sobre la acumulación de A β inducida por HSV-1.....	88
Figura 34. La cicloheximida inhibe la acumulación del péptido A β inducida por HSV-1.....	89
Figura 35. HSV-1 causa un aumento de los niveles de A β intracelular.....	90

Figura 36. Análisis cuantitativo de los niveles de A β secretado en células SK-APP infectadas con HSV-1.....	91
Figura 37. La infección con HSV-1 incrementa la secreción de GLuc.....	92
Figura 38. Efecto de la infección con HSV-1 sobre las actividades α -, β - y γ -secretasa en las células SK-N-MC y SK-APP.....	94
Figura 39. HSV-1 induce una inhibición de la vía no amiloidogénica.....	95
Figura 40. La infección con HSV-1 aumenta la expresión de APP en SK-APP-C3.....	96
Figura 41. HSV-1 induce la acumulación de A β intracelular y la disminución de A β secretado en SK-APP-C3.....	97
Figura 42. Acumulación de vesículas autofágicas inducida por la infección con HSV-1 en células SK-APP.....	98
Figura 43. La infección con HSV-1 induce la acumulación de vesículas autofágicas en las células SK-APP.....	99
Figura 44. Colocalización de GFP-LC3 con el péptido A β en células SK-APP infectadas con HSV-1.....	100
Figura 45. El péptido A β colocaliza con la proteína LC3 endógena en las células SK-APP infectadas con HSV-1	102
Figura 46. La infección con SV-GFP no induce la acumulación de vesículas autofágicas ni del péptido A β en las células SK-APP.....	103
Figura 47. La infección con SV-GFP no modifica los niveles del péptido A β secretado en las células SK-APP.....	104
Figura 48. El marcador lisosomal CD63 no colocaliza con A β ni LC3 endógeno en células infectadas con HSV-1.....	105
Figura 49. El péptido A β no colocaliza con marcadores endosomales tempranos en las células SK-APP infectadas con HSV-1.....	106
Figura 50. Colocalización del péptido A β con el marcador de endosomas tardíos CD222 en las células SK-APP infectadas con HSV-1.....	107
Figura 51. La autofagia no está implicada funcionalmente en la acumulación intracelular del péptido A β inducida por la infección con HSV-1.....	109
Figura 52. Efecto de los inhibidores lisosomales sobre la acumulación del péptido A β en células SK-APP infectadas con HSV-1.....	110

Figura 53. El estrés oxidativo disminuye los niveles de proteínas virales.....	112
Figura 54. El estrés oxidativo disminuye la eficiencia de infección de HSV-1.....	113
Figura 55. El estrés oxidativo incrementa la acumulación de vesículas autofágicas inducida por la infección con HSV-1.....	115
Figura 56. El estrés oxidativo no induce la degradación de proteínas de vida media larga en las células SK-N-MC.....	116
Figura 57. Efecto del estrés oxidativo sobre la acumulación del péptido A β intracelular.....	117
Figura 58. El estrés oxidativo modifica los niveles del péptido A β secretado e intracelular en células SK-APP.....	118
Figura D.1. Hipótesis de los eventos celulares inducidos por la infección con HSV-1	136

SUMMARY

1. SUMMARY

Mounting evidence suggests that Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is involved in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD). HSV-1 is a neurotropic virus that remains latent in host neurons and it is the most common cause of sporadic viral encephalitis. Epidemiological analyses have shown that HSV-1 is a risk factor for AD in people with at least one type 4 allele of the apolipoprotein E gene. Recent studies have also suggested that HSV-1 contributes to the appearance of the biochemical anomalies characteristic of AD brains. In addition, autophagic activity appears to be reduced with ageing, and the final stages of autophagy in neurodegenerative process appear to be impaired. Autophagy is a homeostatic process involved in the turnover or elimination of cytoplasmic components, damaged organelles and protein aggregates via a lysosomal degradation mechanism. HSV-1 can modulate the autophagic process through a mechanism mediated by the viral protein ICP34.5. In this thesis, we report that HSV-1 induces a strong increase in GFP-LC3 and endogenous LC3 lipidation, and triggers the accumulation of intracellular autophagic compartments, mainly autophagosomes, without enhancing autophagic long-lived protein degradation in the late stages of infection. This effect is mediated by blocking the fusion of autophagosomes with lysosomes. Moreover, HSV-1 provokes the strong intracellular accumulation of both the main species of β -amyloid ($A\beta$) in the autophagic compartments and that it is associated with a marked inhibition of $A\beta$ secretion. However, autophagy is not functionally involved in the $A\beta$ accumulation induced by HSV-1 infection. Autophagosomes containing $A\beta$ failed to fuse with lysosomes in HSV-1 infected cells, indicating the impaired degradation of $A\beta$ localized in the autophagic vesicles. In addition, HSV-1 infection was associated with the increase of gamma-secretase activity and the inhibition of the non-amyloidogenic pathway of APP processing. Finally, our results indicate that oxidative stress, one of the earliest events in AD pathogenesis, exacerbates the effects of HSV-1 on APP processing and accumulation of autophagosomes. Taken together, these data suggest that HSV-1 infection deeply controls the autophagic pathway and APP processing. The dysregulation of both processes induced by HSV-1 could contribute to the accumulation of $A\beta$ characteristic of AD.

INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN.

2.1. LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

2.1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES.

En su informe del primer caso de la enfermedad de Alzheimer (EA) en 1907, Alois Alzheimer describió las dos lesiones histopatológicas que han permanecido como marcas características diagnósticas de la enfermedad (Alzheimer, 1907). La primera lesión, los ovillos neurofibrilares, se localiza dentro de las neuronas afectadas y, posteriormente, se comprobó que estaban compuestos mayoritariamente por la proteína asociada a microtúbulos tau anormalmente hiperfosforilada y agregada en filamentos helicoidales apareados (PHFs). La segunda lesión, denominada placa senil, consiste en acúmulos de material extracelular intercalado con axones y dendritas generalmente hinchados o atróficos. Estos depósitos extracelulares fueron identificados cincuenta años después como un tipo específico de amiloide compuesto por agregados fibrilares del péptido β -amiloide ($A\beta$) (Glennner and Wong, 1984; Masters and Beyreuther, 2006). El péptido $A\beta$ se genera a partir del procesamiento proteolítico de la proteína precursora del péptido β -amiloide (APP) y se identificó como un polipéptido de 40-43 aminoácidos cuyas funciones biológicas aún son desconocidas (Pearson and Peers, 2006; Small y cols., 2001). En el estado oligomérico patológico, el péptido $A\beta$ ejecuta un conjunto de acciones citotóxicas consideradas importantes en la evolución de la neurodegeneración de la EA (LaFerla y cols., 2007; Selkoe, 2001).

La EA es la forma más común de demencia afectando a más del 25% de la población mayor de 80 años (Evans y cols., 1989; Ferri y cols., 2005). Es un proceso neurodegenerativo, progresivo e irreversible, que se caracteriza principalmente por una masiva pérdida neuronal y la alteración de los procesos sinápticos localizados en la corteza cerebral, particularmente en los lóbulos frontal y temporal, y en el hipocampo. Los síntomas clínicos más característicos son la pérdida progresiva de la memoria, alteraciones en el comportamiento y la pérdida de la habilidad motora (apraxia), del lenguaje (afasia) y de la percepción de la realidad (agnosia) (McKhann y cols., 1984).

A pesar de la intensa investigación dedicada al esclarecimiento de los mecanismos causantes de la EA, estos son hasta el momento desconocidos. Tan sólo se conoce la causa de un porcentaje inferior al 1% de los casos. Es la denominada EA familiar que presenta un patrón de herencia autosómico dominante y una aparición temprana de los síntomas, generalmente antes de los 65 años de edad. Es una enfermedad monogénica asociada, en la mayoría de los casos, a la presencia de mutaciones en el gen de la presenilina 1 (*PS1*) (Sherrington y cols., 1995), y en menor medida a mutaciones en los genes de la la presenilina 2 (*PS2*) (Levy-Lahad y cols., 1995)

y *APP* (Goate y cols., 1991). Todas estas mutaciones incrementan la producción del péptido A β de 42 aminoácidos (Scheuner y cols., 1996).

El resto de los casos, denominados EA esporádica, presenta una compleja interacción entre factores de susceptibilidad genéticos y ambientales siendo el principal factor de riesgo de EA el alelo 4 del gen de la apolipoproteína E (APOE- ϵ 4) (Corder y cols., 1993; Poirier y cols., 1993). Este riesgo es dependiente de la dosis alélica (Saunders y cols., 1993) y, además, puede anticipar la edad de aparición de los síntomas de la enfermedad (Corder y cols., 1993). Sin embargo, la presencia del alelo apoE- ϵ 4 no es necesaria ni suficiente para el desarrollo de la enfermedad (Richard and Amouyel, 2001).

Entre los factores no genéticos se encuentran la edad avanzada, debido a que el envejecimiento se reconoce como uno de los pasos previos al daño neuronal (Amaducci and Tesco, 1994), el sexo femenino (Fischer y cols., 1991), la existencia de traumatismo craneal severo con pérdida de conocimiento (Graves y cols., 1990), las enfermedades cardiovasculares y factores de riesgo asociados a las mismas tales como hiperlipidemias o diabetes (Breteler, 2000) y las infecciones virales.

2.1.2. LA PROTEÍNA APP: FUNCIÓN, PROCESAMIENTO Y GENERACIÓN DEL PÉPTIDO A β .

APP, APLP1 y APLP2 (proteínas similares al APP 1 y 2) conforman la familia de proteínas APP de mamíferos. Son proteínas integrales de membrana de tipo 1 con un único dominio transmembrana, un largo dominio extracelular N-terminal y un dominio citoplasmático C-terminal (De Strooper and Annaert, 2000).

El gen *APP* está localizado en el cromosoma 21 y tiene una expresión ubicua (Schmechel y cols., 1988). El precursor del mRNA es procesado mediante splicing alternativo dando lugar a las tres isoformas mayoritarias de la proteína denominadas APP₇₇₀, APP₇₅₁ y APP₆₉₅, en relación al número de aminoácidos que contienen (Kitaguchi y cols., 1988). En el cerebro se produce mayoritariamente la isoforma de 695 aminoácidos (Tanaka y cols., 1989) y, por lo tanto, es la que ha sido objeto de un mayor estudio en las investigaciones de la EA.

Desde el descubrimiento de la proteína APP (Kang y cols., 1987) se le han atribuido numerosas funciones fisiológicas en el sistema nervioso central. Distintos estudios han demostrado la implicación del APP en interacciones célula-célula (Schubert y cols., 1989) o célula-matriz extracelular (Sabo y cols., 2001; Soba y cols., 2005). También se le ha asignado funciones de receptor, contribuyendo a la transducción de señales mediante su asociación

con proteínas heterotriméricas que unen GTP (Nishimoto y cols., 1993). Por otra parte, se le ha atribuido un papel importante en el desarrollo cerebral ya que el APP se expresa en altas concentraciones en la glía radial, células que actúan como guías de las neuronas hacia su correcta posición en la corteza embriónica (Trapp and Hauer, 1994), y estudios *in vivo* han adjudicado al APP un papel en la morfogénesis neuronal así como en la formación de sinapsis funcionales (Leyssen y cols., 2005; Priller y cols., 2006). Además, en el cerebro adulto, el APP se expresa en niveles elevados en aquellas regiones que tienen una mayor modificación sináptica (Ouimet y cols., 1994) y se ha demostrado su participación en el proceso de formación de la memoria (Huber y cols., 1993; Zheng y cols., 1996; Mileusnic y cols., 2000).

La proteína APP se localiza en la membrana plasmática (Kinoshita y cols., 2003), pero también en membranas intracelulares de la red de Golgi (Xu y cols., 1995), el retículo endoplásmico (RE) (Mattson y cols., 2001) y en membranas lisosomales (Tagawa y cols., 1992), endosomales (Kinoshita y cols., 2003) y mitocondriales (Mizuguchi y cols., 1992), por lo que es procesada en distintos compartimentos. En células de mamífero, la proteína APP madura a través de la ruta secretora constitutiva, siendo modificada postraduccionalmente mediante N- y O- glicosilación, fosforilación y sulfatación en residuos de tirosina (Weidemann y cols., 1989). Solamente una pequeña fracción de las moléculas de APP recién sintetizadas están presentes en la membrana plasmática, el resto se localiza mayoritariamente en el Golgi (Gandy y cols., 1994). Una vez en la membrana celular, la proteína APP puede ser reinternalizada a compartimentos endosomales/lisosomales a través de vesículas revestidas de clatrina y, desde aquí, reciclada a la superficie celular o transportada a lisosomas donde es degradada (Haass y cols., 1992a).

El péptido A β se origina por el procesamiento proteolítico de APP (Kang y cols., 1987) y es producido durante el metabolismo constitutivo de la célula (Haass y cols., 1992b). Existen dos rutas principales de procesamiento de la proteína APP con la intervención de tres enzimas denominadas α -secretasa, β -secretasa y γ -secretasa (en la figura I.1 se muestra un esquema de las dos vías de procesamiento de APP). Varios miembros de la familia de proteínas adamalisina o ADAMs (desintegrinas y metaloproteinasas) actúan como α -secretasas, entre las que se incluyen ADAM 17 (también llamada TACE o convertasa del factor α de necrosis tumoral), ADAM10 y ADAM9 (Asai y cols., 2003). La actividad α -secretasa se localiza principalmente en la membrana plasmática celular (Sisodia, 1992). Las enzimas β -secretasas han sido identificadas como aspartil proteasas asociadas a membrana, especialmente en la red trans-Golgi (von Arnim y cols., 2006) y endosomas (Capell y cols., 2000), y se han denominado BACE1 y BACE2 (proteasa que corta en el sitio β de la proteína APP) (Farzan y cols., 2000; Vassar, 2004). Finalmente, la actividad γ -secretasa es llevada a cabo por un complejo con actividad enzimática intramembrana formado por cuatro componentes: PS-1 o PS-2, que poseen la actividad catalítica, nicastrina, APh-1

(anterior pharynx defective-1) y PEN-2 (presenilin enhancer 2) (Kimberly y cols., 2003). La actividad γ -secretasa ha sido detectada en distintas localizaciones celulares incluyendo la membrana plasmática y endosomas tempranos (Runz y cols., 2002), endosomas tardíos y vesículas autofágicas (Yu y cols., 2005; Yu y cols., 2004b) y lisosomas (Pasternak y cols., 2003).

La ruta predominante de procesamiento de APP es la denominada no amiloidogénica. Esta vía excluye la generación del péptido β -amiloide (Selkoe, 1991). Concretamente, la proteína APP es procesada por la enzima α -secretasa dentro de la secuencia del péptido A β , causando la secreción del dominio N-terminal, denominado APP soluble α (sAPP α) (Allinson y cols., 2003). El fragmento C-terminal resultante de 83 aminoácidos (C83 o α -CTF) permanece anclado en la membrana y, a continuación, es procesado por la enzima γ -secretasa generando un pequeño péptido denominado p3 (Haass y cols., 1993) y un fragmento intracelular de APP denominado AICD o γ -CTF (Haass y cols., 1993).

La segunda ruta es la vía amiloidogénica en la que se genera el péptido A β por la acción secuencial de dos proteasas (Haass, 2004). El corte inicial, llevado a cabo por la enzima β -secretasa en el extremo N-terminal de la secuencia de A β , conlleva la liberación del fragmento APP soluble β (sAPP β) y la generación de un fragmento C-terminal anclado en la membrana de 99 aminoácidos denominado C-99 o β -CTF (Vassar, 2001). Finalmente, el procesamiento de C99 por el complejo enzimático de la γ -secretasa produce el péptido A β y el fragmento γ -CTF (Gandy, 2005). La ruta amiloidogénica genera principalmente dos especies de péptidos A β : una de 40 (A β 40) y otra de 42 (A β 42) aminoácidos. Aunque la especie más abundante es A β 40 (aproximadamente el 90%) y, ambas especies son neurotóxicas e insolubles, el péptido A β 42 se agrega con mayor facilidad y, por tanto, es más proclive a la formación de las placas amiloides (Iwatsubo y cols., 1994).

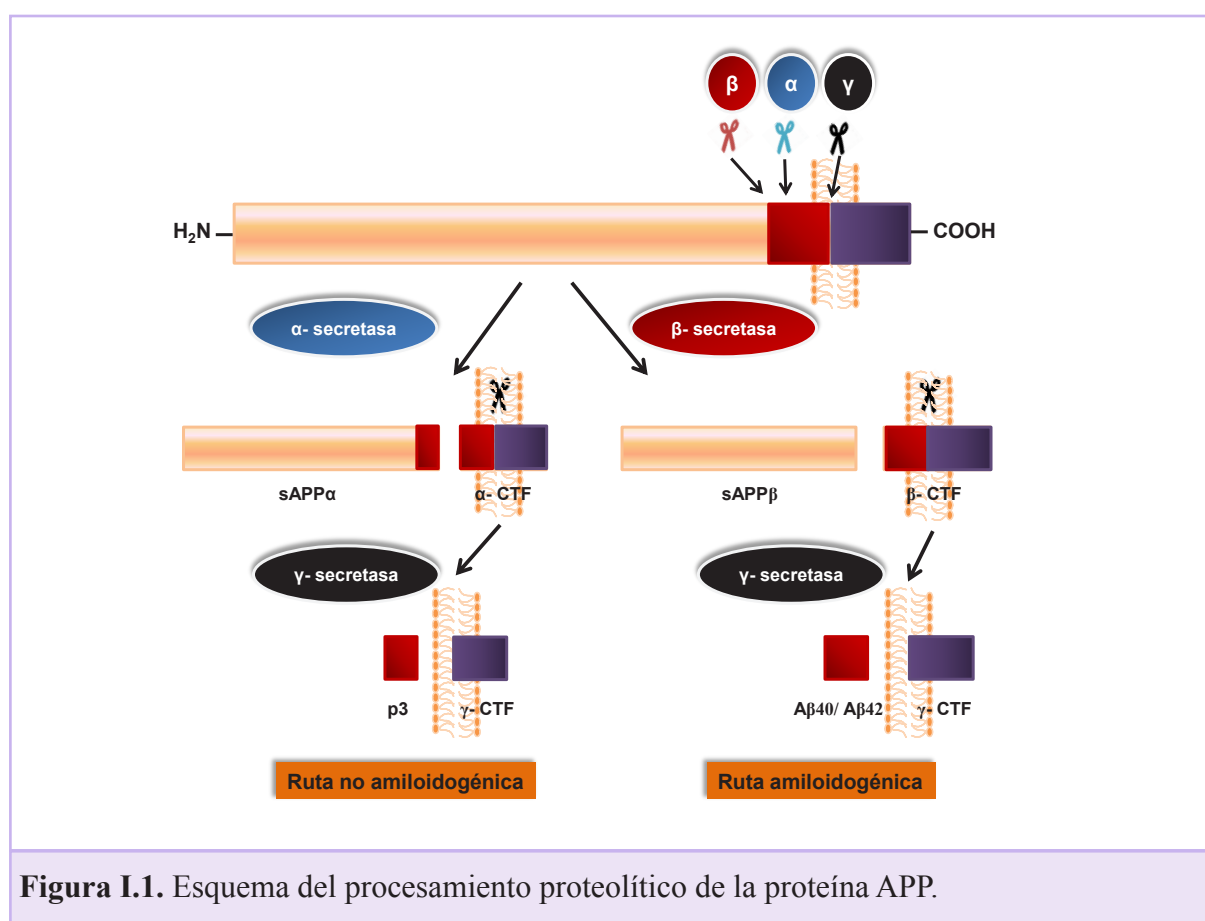


Figura I.1. Esquema del procesamiento proteolítico de la proteína APP.

2.1.3. EL PÉPTIDO A β INTRACELULAR.

Inicialmente, el péptido A β fue identificado como un componente de las placas amiloides extracelulares (Glennner and Wong, 1984). Posteriormente, un gran número de estudios han demostrado la presencia de A β intraneuronal en cerebros de individuos controles y de pacientes de EA y síndrome de Down, así como en cerebros de ratones transgénicos de APP humano (Grundke-Iqbal y cols., 1989). La acumulación y la agregación del péptido β -amiloide en el cerebro son considerados los eventos centrales de la patogénesis de la EA constituyendo la denominada hipótesis amiloide de la EA (Hardy and Selkoe, 2002). En los últimos años, distintos estudios han sugerido que la acumulación del péptido A β intracelular podría ser un marcador temprano característico de la EA (LaFerla y cols., 2007), precediendo a la formación de los depósitos extracelulares de A β , y que la oligomerización de A β podría desembocar en la muerte neuronal característica de la misma (Li y cols., 2007; Cappai and Barnham, 2008). Además, se ha establecido que la mayor parte del péptido A β acumulado en las neuronas corresponde a la especie de 42 aminoácidos, que es la más amiloidogénica y neurotóxica (Gouras y cols., 2000; Takahashi y cols., 2002).

La generación de A β tiene lugar en diferentes orgánulos celulares. Así, la gran mayoría del péptido A β se produce en la membrana plasmática, el RE y el sistema de Golgi y es secretado de forma constitutiva a través de la vía secretora (Busciglio y cols., 1993). La proteína APP que no se procesa en la membrana plasmática es reinternalizada en endosomas tempranos donde se encuentra la actividad β -secretasa que genera el fragmento β -CTF (Golde y cols., 1992). Este fragmento puede ser devuelto al RE o a la membrana plasmática, donde es procesado por la γ -secretasa generando el péptido A β , o puede ser procesado en el sistema endosomal/lisosomal produciéndose A β (Koo and Squazzo, 1994). En este sentido, se ha descrito que el péptido A β 42 se localiza principalmente en cuerpos multivesiculares (MVB), un tipo de endosomas tardíos, de neuronas de cerebros de pacientes de EA (Takahashi y cols., 2002). Recientemente, también se ha descrito la formación de A β en vesículas autofágicas (Yu y cols., 2005; Yu y cols., 2004b). Además, el A β secretado al medio extracelular puede ser internalizado en endosomas en células del sistema nervioso central. Este proceso está mediado por la unión a receptores de la superficie celular, entre los que se incluyen la proteína relacionada con los receptores de lipoproteínas de baja densidad (LRP) (Bu y cols., 2006; Cam y cols., 2004), receptores de productos terminales de glicación avanzada (RAGE) (Deane y cols., 2003; Yan y cols., 1996), receptores nicotínicos de acetilcolina (Nagele y cols., 2002) y receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) (Snyder y cols., 2005). Algunos de los efectos tóxicos de A β está mediado por la interacción con estos receptores.

El estado de agregación de A β es un factor importante en la patología de EA. El péptido A β se produce como monómero pero puede agregarse formando distintos complejos multiméricos, desde dímeros o trímeros hasta protofibrillas o fibrillas de alto peso molecular. Inicialmente, la oligomerización de A β ocurre en el interior de las células y, de manera posterior, se acumulan en el espacio extracelular formando placas seniles (Takahashi y cols., 2004; Walsh y cols., 2000). Las especies oligoméricas de A β son las más patológicas afectando a la memoria y a la función sináptica (Lesne y cols., 2006).

Una cuestión clave es la investigación del papel de A β intracelular en el cerebro en condiciones fisiológicas y patológicas. En los últimos años han surgido numerosas evidencias que muestran los efectos del péptido A β intraneuronal *in vivo*. El péptido A β puede contribuir a la patología de EA a través de la inhibición de la actividad de enzimas mitocondriales que causan una reducción del consumo de oxígeno (Caspersen y cols., 2005), así como mediando la inhibición de la función del proteasoma (Almeida y cols., 2006). También se ha descrito que el péptido A β intraneuronal provoca una disfunción sináptica y alteraciones en la memoria (Billings y cols., 2005; Oddo y cols., 2003). Además, se han propuesto otros mecanismos por los cuales el péptido A β ejerce su papel citotóxico (Cappai and Barnham, 2008) como la inhibición de la

actividad redox celular (Shearman y cols., 1994), la inducción de apoptosis y la activación de caspasas (Lustbader y cols., 2004) así como su posible contribución al proceso de fosforilación de tau y de formación de PHFs (Lewis y cols., 2001; Zheng y cols., 2002).

La degradación de A β *in vivo* está mediada por varias proteasas. Las proteasas mejor caracterizadas son metalopeptidasas como la neprilisina (Iwata y cols., 2000); la enzima degradadora de insulina (Kurochkin and Goto, 1994) y las enzimas degradadoras de la endotelina ECE1 y ECE2 (Eckman y cols., 2001; Eckman y cols., 2003). Dado su pH óptimo de funcionamiento, estas enzimas no actúan en compartimentos ácidos como los endosomas tardíos o los lisosomas. En lisosomas, la proteasa catépsina B ha sido propuesta como enzima que degrada el péptido A β , especialmente la especie de 42 aminoácidos (Mueller-Steiner y cols., 2006).

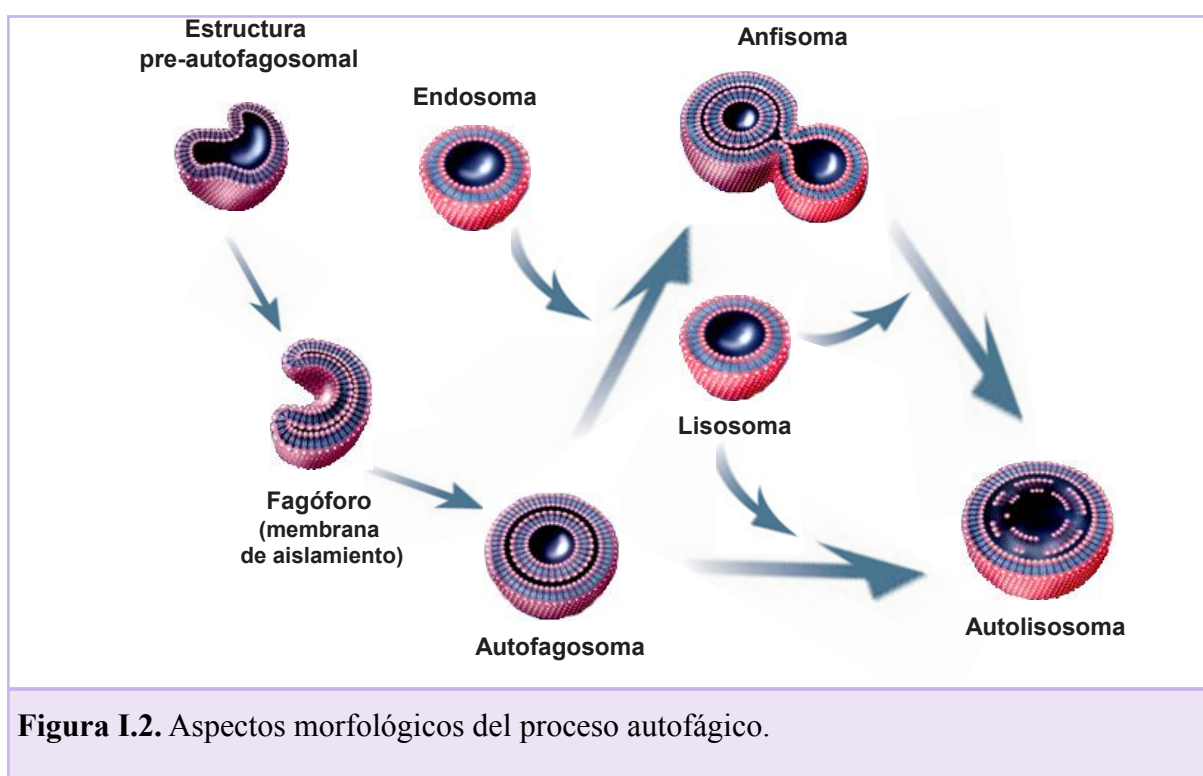
2.1.4. LA AUTOFAGIA EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

2.1.4.1. Aspectos generales de la autofagia.

La homeostasis celular requiere un equilibrio altamente regulado entre la síntesis y la degradación de proteínas. Alteraciones de este equilibrio provocan numerosos procesos patológicos. Existen dos sistemas principales implicados en la degradación de proteínas de mamíferos: la vía ubiquitina-proteasoma y la vía lisosomal. El proteasoma está implicado en la degradación de proteínas de vida media corta manteniendo un reciclaje continuo de proteínas celulares. Es un gigantesco complejo multiproteico que degrada específicamente proteínas que han sido señalizadas mediante la adición de moléculas de ubiquitina. Dentro de las vías lisosomales, hay dos tipos principales: la heterofagia, que media la degradación de proteínas de membrana plasmática y extracelulares (son los procesos de endocitosis y fagocitosis); y la autofagia, que es la ruta encargada de la degradación de proteínas intracelulares de vida media larga, de orgánulos enteros y de agregados proteicos (Dunn, 1994). Existen tres tipos de autofagia, siendo la macroautofagia la más relevante de ellas y por eso se la denomina en la literatura como autofagia. Los otros dos tipos son la microautofagia y la autofagia mediada por chaperonas (Mizushima, 2002).

El proceso autofágico se inicia con el secuestro de los constituyentes citoplasmáticos, incluyendo orgánulos enteros, por unas cisternas membranosas denominadas membranas de aislamiento o fagóforos (Fengsrud y cols., 2000). Aunque el origen de estas membranas de aislamiento es controvertido, se ha propuesto que pueden ser sintetizadas de novo o formarse a partir de membranas preexistentes como el RE (Hayashi-Nishino y cols., 2009) y el aparato de Golgi (Fukuda and Itoh, 2008). Posteriormente, tiene lugar la expansión del

fagóforo dando lugar a unas estructuras de doble membrana denominadas autofagosomas o vesículas autofágicas. A continuación, los autofagosomas maduran mediante la fusión con lisosomas generándose los autolisosomas, en cuyo interior los contenidos citoplasmáticos y la membrana interna del autofagosoma son degradados debido a la acción de las enzimas hidrolíticas aportadas por los lisosomas (Mizushima, 2002). Además, la familia de orgánulos autofágicos incluye un compartimento intermedio, el anfísoma, formado por la fusión entre el autofagosoma y el endosoma. Posteriormente, el anfísoma se fusiona también con vesículas lisosomales produciéndose la degradación completa del contenido vesicular (Berg y cols., 1998; Gordon and Seglen, 1988). En la Figura I.2 se muestra un esquema con los orgánulos autofágicos implicados en esta vía de degradación.



Los mecanismos moleculares del proceso autofágico fueron identificados inicialmente en levaduras. Posteriormente, los estudios en distintos sistemas eucarióticos revelaron la conservación de la maquinaria autofágica (Levine and Klionsky, 2004; Reggiori and Klionsky, 2002). En los últimos años se han descubierto un gran número de genes implicados en el proceso autofágico denominados APG (Tsukada and Ohsumi, 1993) y AUT (Thumm y cols., 1994). Posteriormente, se unificó la nomenclatura llamándose los genes ATG (genes relacionados con la autofagia) y sus productos génicos Atg (proteínas relacionadas con la autofagia) (Klionsky y cols., 2003).

El proceso autofágico depende de dos sistemas de conjugación, similares a los sistemas de ubiquitinación, que son esenciales para la formación del autofagosoma (Mizushima y cols., 1998). El primer sistema de conjugación media la unión de Atg12 y Atg5. Este conjugado posteriormente se une no covalentemente a Atg16, formando un complejo macromolecular de 800 KDa. Esta estructura está asociada con la membrana externa del autofagosoma durante su elongación y se disocia antes de la formación completa de la vesícula. El complejo Atg5-Atg12-Atg16 es necesario para la formación del segundo conjugado (Mizushima y cols., 2001). El segundo sistema de conjugación implica la unión covalente de la proteína LC3 (cadena ligera 3 de la proteína 1 asociada a microtúbulos) con el lípido fosfatidiletanolamina. LC3 es una proteína asociada a microtúbulos y fue la primera proteína identificada en la membrana del autofagosoma (Kabeya y cols., 2000). Inmediatamente después de su síntesis, la región C-terminal de LC3 es eliminada, dando lugar a la isoforma LC3-I que reside en el citoplasma celular. Cuando el proceso autofágico es activado, LC3-I es modificado postraduccionalmente mediante su unión covalente a fosfatidiletanolamina, generándose la isoforma LC3-II, la cual se une fuertemente a la membrana del autofagosoma incluso después de su formación completa (Mizushima y cols., 2002), motivo por el cual es el marcador más utilizado para la identificación de autofagosomas.

Aunque originalmente estaba considerado como un proceso inducible, la autofagia es un proceso constitutivo implicado en el mantenimiento de la homeostasis celular, controlando el reciclaje de proteínas de vida media larga y de orgánulos, así como la eliminación de proteínas mutadas o mal plegadas, agregados proteicos insolubles y orgánulos disfuncionales. Además, la autofagia es inducida por múltiples señales intracelulares o extracelulares capaces de generar un estrés a la célula como son la privación de nutrientes, un cambio de volumen celular, estrés oxidativo, acumulación de proteínas mal plegadas, señales hormonales e irradiación ultravioleta (Codogno, 2004). De hecho, la principal función de la autofagia en muchos organismos es la adaptación a la falta de nutrientes. Ante la privación de nutrientes, el proceso autofágico actúa degradando y reciclando los componentes celulares para la biosíntesis de macromoléculas y la obtención de energía. Además, este sistema de degradación está implicado en múltiples procesos fisiológicos como la diferenciación celular, el desarrollo embrionario y la muerte celular (Yu y cols., 2004a). Por otra parte, alteraciones en la función autofágica están asociadas a procesos patogénicos entre los que destacan enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson y la EA (Martinez-Vicente and Cuervo, 2007), cáncer (Levine, 2007) y diferentes miopatías (Shintani and Klionsky, 2004). En los últimos años se ha descrito un papel importante de la autofagia en la protección frente a patógenos intracelulares, interviniendo tanto en mecanismos de inmunidad innata, mediando la destrucción de bacterias y virus secuestrados

en las vesículas autofágicas (Kirkegaard y cols., 2004), como de inmunidad adaptativa participando en el procesamiento de antígenos virales y bacterias para su presentación mediante el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (English y cols., 2009; Paludan y cols., 2005).

La autofagia es particularmente importante en el sistema nervioso central donde el control de calidad de las proteínas y el recambio de los orgánulos es más relevante que en las células mitóticas (Boland and Nixon, 2006). Además, la autofagia tiene una actividad basal elevada en neuronas sanas previniendo, de esta forma, la acumulación de agregados de proteínas que afectan a las funciones de las neuronas y que son degradados específicamente por la vía autofágica (Rubinsztein y cols., 2005). Estudios recientes en modelos murinos han demostrado la importancia de esta función constitutiva de la autofagia en el continuo reciclaje de los componentes citoplasmáticos en las neuronas ya que ratones defectivos en *ATG5* o *ATG7*, dos genes esenciales para el proceso, mostraban una degeneración severa en el sistema nervioso central acompañada de la acumulación de agregados de proteínas ubiquitinadas en las neuronas (Hara y cols., 2006; Komatsu y cols., 2006).

2.1.4.2. Implicación de la autofagia en la enfermedad de Alzheimer.

En relación con la EA, evidencias experimentales indican que alteraciones de la vía autofágica podrían contribuir a la patogénesis de este desorden. Previamente, se había demostrado la existencia de una disfunción acusada del sistema lisosomal en esta enfermedad (Cataldo y cols., 1990; Cataldo y cols., 1995). Posteriormente, se comprobó la presencia de vesículas autofágicas en las neuritas distróficas de la corteza y el hipocampo en cerebros de ratones transgénicos que expresan APP humano (Yu y cols., 2005). Además, estas vesículas contenían la proteína APP, las distintas especies del péptido A β y las enzimas β - y γ - secretasa, necesarias para su generación (Yu y cols., 2004b). En este sentido, hay un aumento significativo de la producción de A β en condiciones de activación de la autofagia en fibroblastos de ratón (Yu y cols., 2005) y en neuronas humanas (LeBlanc y cols., 1996). El péptido A β generado en las vesículas autofágicas es dirigido hacia los lisosomas, el orgánulo destino de la vía autofágica, donde es degradado por las catepsinas lisosomales. Así, se ha descrito que la autofagia eficiente tiene un papel protector frente a la neurotoxicidad inducida por A β en células de neuroblastoma humano (Hung y cols., 2009).

De esta forma, condiciones que retrasen o inhiban la fusión de los autofagosomas con los lisosomas o la maduración de los autolisosomas deberían provocar un aumento de la cantidad de vesículas autofágicas y de los niveles de A β . Estas condiciones tienen lugar en cerebros de pacientes de EA y en modelos murinos de EA en los que se observa una inducción temprana, anterior a la acumulación del péptido A β , y una alteración de las etapas finales de

la autofagia (Nixon y cols., 2005; Yu y cols., 2005). Estos eventos tienen como consecuencia la acumulación masiva de diferentes compartimentos autofágicos en neuronas afectadas y en neuritas distróficas (Nixon y cols., 2005). Además, la presencia de neuritas distróficas repletas casi enteramente de vesículas autofágicas es una característica específica de procesos neurodegenerativos que generan depósitos de A β (Benzing y cols., 1993). En este sentido, se ha demostrado que mutaciones en la *PS1* causantes de EA comprometen severamente el reciclaje de proteínas mediado por autofagia (Yu y cols., 2005), afectando gravemente a procesos neuronales dependientes de autofagia como son el procesamiento de APP y la acumulación de A β (Nixon, 2006). Todas estas evidencias sustentan la hipótesis de que la autofagia ejerce un papel protector frente a los procesos neurodegenerativos.

2.1.5. EL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

El estrés oxidativo contribuye al daño neuronal en estados patológicos agudos del cerebro como la isquemia y el trauma cerebral, así como en enfermedades neurodegenerativas del sistema nervioso central, incluyendo la EA (Andersen, 2004). El estrés oxidativo se produce cuando tiene lugar una alteración del balance oxidativo celular, de manera que la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) excede las defensas antioxidantes de la célula (Smith y cols., 2000). En condiciones normales, los niveles de ROS generados por los procesos celulares (radicales superóxido, peróxido de hidrógeno, óxido nítrico y peroxinitrito) son controlados por enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa, la catalasa y la superóxido dismutasa y por moléculas antioxidantes no enzimáticas como el glutatión, vitamina E, ácido ascórbico y carotenoides (Su y cols., 2008). En relación con la EA, diversos estudios han demostrado un aumento de las principales actividades enzimáticas antioxidantes en la corteza y en el hipocampo de cerebros de pacientes de la enfermedad (Pappolla y cols., 1992; Zelman y cols., 1989).

El cerebro depende de la respiración aerobia y consume una gran cantidad de oxígeno, por lo que es un órgano particularmente susceptible al estrés oxidativo (Shulman y cols., 2004). Por otra parte, el envejecimiento es un proceso relacionado con un aumento de la producción de ROS y una disminución en los mecanismos antioxidantes (Harman, 1981), por lo que en enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la edad, como la EA, el estrés oxidativo no sólo es un evento temprano de la enfermedad si no que también participa en su comienzo mediando la activación de vías de señalización inductoras de apoptosis (Marques y cols., 2003; Su y cols., 2008).

Además de la acumulación intraneuronal de A β , el daño oxidativo y la activación de la autofagia son acontecimientos tempranos en la EA. Recientemente, se han relacionado estos tres procesos en células de neuroblastoma humano donde se ha descrito que el estrés

oxidativo induce la acumulación de A β a través de la inducción de un proceso autofágico (Zheng y cols., 2006). Uno de los mecanismos por los que el péptido A β induce toxicidad neuronal es mediante la generación de estrés oxidativo. Así, el péptido A β es capaz de inducir la oxidación de diferentes biomoléculas, incluyendo la peroxidación de lípidos de membrana y lipoproteínas (Varadarajan y cols., 2000), la generación de H₂O₂ en células en cultivo (Behl y cols., 1994; Huang y cols., 1999), el daño oxidativo en el DNA (Xu y cols., 2001) y la inactivación del transporte de glucosa (Mark y cols., 1997).

En la EA, existen diversas fuentes que contribuyen a la producción de radicales libres. Distintos metales, como el hierro y el aluminio, pueden catalizar la formación de ROS acumulándose en los depósitos de A β y los ovillos neurofibrilares (Good y cols., 1992). La microglía activada, que rodea la mayoría de las placas seniles (Cras y cols., 1990) es una fuente de ROS (Colton and Gilbert, 1987). La mitocondria es el principal orgánulo productor de ROS y en la EA se ha descrito la presencia de mitocondrias defectivas, detectándose las principales alteraciones en el genoma mitocondrial y en las enzimas clave responsables del metabolismo oxidativo en la célula, como la piruvato dehidrogenasa o la citocromo oxidasa (Davis y cols., 1997; Gibson y cols., 1998).

2.1.6. HIPÓTESIS INFECCIOSA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

A pesar de las intensas investigaciones llevadas a cabo hasta el momento, todavía se desconocen los mecanismos responsables de la disfunción y muerte neuronal selectiva que tiene lugar en la EA. Varias hipótesis independientes intentan relacionar las lesiones histopatológicas con diferentes factores como el genotipo APOE (Corder y cols., 1993; Roses, 1995), la hiperfosforilación de proteínas del citoesqueleto (Trojanowski y cols., 1993), el estrés oxidativo (Smith y cols., 2000), la inflamación (Pasinetti, 1996) y el metabolismo del péptido β -amiloide (Selkoe, 1997). Sin embargo, debido a la naturaleza multifactorial de la EA esporádica, ninguna de estas teorías por sí sola es suficiente para explicar la diversidad de anomalías bioquímicas y patológicas de la enfermedad.

En las últimas décadas se ha reforzado la hipótesis de una etiología infecciosa de muchas enfermedades crónicas, incluida la EA (Honjo y cols., 2009). En la década de los 70, varias investigaciones descubrieron elevados niveles de anticuerpos frente al virus *Herpes Simplex* tipo I (HSV-1) en pacientes con desórdenes psiquiátricos (Cleobury y cols., 1971) y la presencia de DNA viral en los cerebros de pacientes ancianos con demencia (Sequiera y cols., 1979). A la vista de estos resultados, numerosos grupos han investigado la posible relación entre la EA esporádica y distintos tipos de virus (citomegalovirus, poliovirus, virus de la gripe tipo A y B, adenovirus y virus del sarampión) sin encontrar ninguna asociación (Renvoize y cols.,

1987; Renvoize and Hambling, 1984). Posteriormente, se demostró la existencia de genomas de HSV-1 en el suero y en el cerebro de pacientes de EA (Jamieson y cols., 1991; Jamieson y cols., 1992; Miklossy y cols., 1994). Más recientemente, diferentes estudios mostraron que tres tipos de bacterias, (espiroquetas, *Chlamydia pneumoniae* y *Helicobacter pylori*) (Miklossy y cols., 1994; Balin y cols., 1998; Kountouras y cols., 2006), y el Herpesvirus humano 6 (HHV6) (Lin y cols., 2002) podrían tener un papel en la etiología de la EA. Sin embargo, de todos los patógenos estudiados en relación con la EA, la infección con HSV-1 presenta las evidencias más consistentes (Itzhaki and Wozniak, 2008).

Se ha demostrado que los cerebros de pacientes de EA presentan una abundante respuesta inflamatoria y un daño oxidativo en etapas tempranas sugiriendo un papel de estos procesos en la etiología de la enfermedad (Akiyama y cols., 2000; Mamelak, 2007). En este sentido, muchos de los agentes infecciosos asociados a la EA producen inflamación y daño oxidativo de forma continua en el cerebro indicando, por tanto, que estos patógenos podrían contribuir a la patología de EA. Estos datos refuerzan la hipótesis de que la combinación de infecciones del sistema nervioso central con factores de riesgo genéticos o de otra clase, como el APOE-ε4 o la edad avanzada, podría contribuir a la patogénesis, de forma que las infecciones en el cerebro podrían considerarse como factores de riesgo para la EA esporádica.

2.2. EL VIRUS *HERPES SIMPLEX* TIPO 1.

2.2.1. ASPECTOS GENERALES.

El virus HSV-1 está clasificado dentro de la familia *Herpesviridae*, subfamilia *alfaherpesvirinae*, género *Simplexvirus* y se caracteriza por tener un rango de hospedador amplio, desarrollar un ciclo reproductivo relativamente corto, expandirse rápidamente en cultivo, destruir eficientemente las células infectadas y establecer infecciones latentes, principalmente en los ganglios sensoriales (Roizman, 1990).

El virus HSV-1 es un agente ubicuo, infecta a humanos y aproximadamente el 90% de la población adulta muestra evidencias serológicas de la infección. Las manifestaciones externas más comunes son benignas, incluyendo lesiones en la mucosa epitelial de la boca (llagas labiales), de los genitales y de la zona ocular (lesiones en la córnea, queratitis). Sin embargo, los casos más agudos de infección en el sistema nervioso central pueden degenerar en encefalitis (Johnson, 1998), una inflamación muy grave del cerebro que suele afectar a pacientes inmunosuprimidos.

Los viriones maduros de HSV-1 constan, desde el interior a la superficie, de varias partes:

- El núcleo electrodenso que contiene el DNA viral.
- Una cápsida icosapentahédrica de 125 nm de diámetro, formada por 150 hexones y 12 pentones (162 capsómeros), en la que se identifican 7 proteínas virales (VP5, VP19c, VP23, VP26, VP21 y el producto del gen UL6) (Newcomb y cols., 2001; Newcomb y cols., 1993).
- El tegumento, capa amorfa y asimétrica que rodea a la cápsida, contiene al menos 15 proteínas virales las cuales tienen un importante papel estructural y funcional durante la infección (Haarr and Skulstad, 1994).
- La envoltura es una capa lipídica de origen celular que contiene al menos 12 glicoproteínas virales diferentes.

El genoma del virus HSV-1, con un tamaño de 152 kpb, está formado por una molécula lineal de DNA de doble cadena, que codifica para 84 genes que se expresan de una forma coordinada y secuencial (Honess and Roizman, 1974). Los genes de HSV-1 se dividen en tres clases: los genes α o inmediatamente tempranos (IE), son los primeros en expresarse tras la infección y su transcripción no depende de la síntesis de novo de proteínas. Se han descrito 5 proteínas virales IE: ICP47, ICP0, ICP4, ICP22 e ICP27 y todas menos ICP47 tienen un papel crítico en la regulación de la expresión de los genes de HSV-1 (Weir, 2001). ICP47 interacciona con el transportador asociado al procesamiento de antígenos TAP, una de las proteínas que interviene en el proceso de presentación de antígenos por el MHC de tipo I, interfiriendo así en el procesamiento y presentación de antígenos virales en la membrana de la célula huésped (Hill y cols., 1995; Tomazin y cols., 1996). Los productos IE inducen la transcripción de los genes β o tempranos (E), que codifican preferentemente proteínas que intervienen en la síntesis de DNA viral, como son la DNA polimerasa viral (ICP8) y la timidina quinasa, y en la expresión de los genes tardíos (Gao and Knipe, 1991). Tras la replicación viral se expresan los genes tardíos o γ (L) que codifican en su mayoría proteínas estructurales de la cápsida, proteínas del tegumento y glicoproteínas (Roizman, 1996).

En las células infectadas con HSV-1, los procesos de transcripción y traducción están totalmente controlados por el virus, de forma que la síntesis de proteínas celulares está prácticamente inhibida. Se ha descrito que la proteína viral ICP22 junto con UL13, proteína quinasa del tegumento, modifica el estado de fosforilación de la subunidad catalítica de la RNA polimerasa II para favorecer la transcripción de los genes virales (Long y cols., 1999). Por otra parte, ICP27 interfiere en el procesamiento de los mRNAs celulares modificando el

estado de fosforilación de varios factores que participan en dicho procesamiento (Hardy and Sandri-Goldin, 1994; Sciabica y cols., 2003). Además, la proteína viral del tegumento vhs es responsable de la degradación de los mRNAs celulares (Schek and Bachenheimer, 1985).

La entrada de HSV-1 en las células es un proceso que comprende distintos pasos y requiere la interacción de varias glicoproteínas virales con diferentes receptores celulares (Spear, 2004). La interacción inicial de HSV-1 con la superficie celular ocurre mediante la unión de distintos dominios de las glicoproteínas gB y gC a los glicosaminoglicanos de la superficie celular, principalmente el heparán sulfato (Herold y cols., 1991; Herold y cols., 1994). Esta unión no es suficiente para la entrada viral pero facilita la interacción posterior de las proteínas gB y gD a receptores específicos de la superficie celular. Se han identificado varios receptores mediadores de la entrada de HSV-1: el mediador de la entrada de herpesvirus, HVEM o HveA, miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral que interacciona con gD (Montgomery y cols., 1996); HveB y HveC, nectina 2 y 1 respectivamente, son moléculas de adhesión celular pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Warner y cols., 1998) (Geraghty y cols., 1998) y sitios específicos en el heparán sulfato (3-O-S) generados por la acción de 3-O-sulfotransferasas (Shukla y cols., 1999). También se ha identificado un receptor específico de gB, el receptor Ig-like pareado tipo 2 (PILR α) y hay evidencias de la existencia de otros receptores alternativos de gB (Sato y cols., 2008). La unión de gD y gB a uno de estos receptores puede desencadenar la fusión entre la envoltura del virión y la membrana celular. Esta fusión requiere la acción concertada de varias glicoproteínas virales como son gB, gD, gH y gL (Spear y cols., 2000).

Una vez en el citoplasma, la cápsida, junto con el tegumento, es transportada por el citoesqueleto hasta ser atraída por receptores de importinas en el complejo del poro nuclear, donde la cápsida se abre y se libera el genoma viral al interior del núcleo. Este transporte retrógrado del virus está mediado por la unión directa de la proteína viral UL34 con la dineína, motor celular implicado en el transporte desde la periferia al núcleo celular (Ye y cols., 2000).

La transcripción y la replicación viral tiene lugar en el núcleo de las células infectadas en unas regiones conocidas como centros de replicación viral (VRCs) (Quinlan y cols., 1984). Los VRCs son estructuras altamente complejas en las que intervienen proteínas virales y celulares necesarias para la replicación y expresión de los genes virales. El DNA viral es transcrito por la RNA polimerasa II celular, pero con la participación de factores virales en los distintos estadios de la infección. La transcripción de los genes IE se produce inmediatamente después de la entrada del DNA viral en el núcleo, no requiere la síntesis de novo de proteínas virales y es activada por la proteína viral del tegumento VP16. Para ello, VP16 forma un complejo

con dos factores celulares, HCF-1 y Oct-1, que se une al promotor de los genes IE y activa su transcripción, estabilizando el complejo de la RNA polimerasa II (O'Hare, 1993).

Las proteínas de la cápsida, una vez sintetizadas, pasan al interior del núcleo, se ensamblan y forman las nuevas cápsidas, en las que se integra el DNA viral recién sintetizado. La cápsida, junto con la mayoría de proteínas que forman el tegumento, es transportada de una forma dependiente de la red de microtúbulos, mientras que las proteínas de la envuelta y las proteínas del tegumento VP16 y VP22 son transportadas hasta la membrana plasmática a través de vesículas procedentes del aparato de Golgi. La adquisición de la envuelta viral es un proceso que hasta el momento no ha sido bien definido, aunque podría ser un proceso secuencial que desembocaría en la salida de la partícula viral de la célula infectada mediante exocitosis (Miranda-Saksena y cols., 2009). Existen distintas proteínas virales que pueden interaccionar con la quinesina, motor celular encargado del transporte hacia la periferia celular, pero se ha propuesto como candidata la proteína del tegumento US11 de HSV-1 (Diefenbach y cols., 2002).

2.2.2. HSV-1 EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

El virus HSV-1 presenta un tropismo neural e infecta comúnmente las células epiteliales de las membranas mucosas y las neuronas sensoriales que inervan estos epitelios. Por otra parte, el HSV-1 tiene la capacidad de establecer latencia durante el resto de la vida del hospedador dentro de las neuronas, proceso en el que el virus silencia progresivamente la expresión de sus genes hasta dejar su genoma de forma episomal en el núcleo de las células. La reactivación del virus latente por distintos factores permite la reinfección de los tejidos inervados por la neurona sensorial así como la propagación de la infección viral a otras áreas inervadas por la neurona (Garner, 2003).

La ruta más común de infección del virus HSV-1 se inicia por la generación de una herida en la mucosa epitelial de la boca y la presencia de virus infectivos en la zona (Garner, 2003). El virus infecta a las células epiteliales, replica su DNA y forma la progenie viral que sale del epitelio y entra en contacto con las terminaciones nerviosas que lo inervan, infectando a las neuronas sensoriales. Una vez dentro de las neuronas, las nucleocápsidas son transportadas de forma retrógrada hacia los somas neuronales en los ganglios sensoriales, como son el ganglio trigémino o el ganglio de la espina dorsal, y aquí el virus se replica o adquiere un estado de latencia, que puede mantener incluso durante toda la vida del individuo infectado hasta que se produce la reactivación. Así, una de las características principales del virus HSV-1 es su capacidad para establecer latencia (Steiner and Kennedy, 1995). En este estado, sólo se han detectado en las células infectadas un grupo muy reducido de transcritos, llamados transcritos asociados a latencia (LAT) (Stevens y cols., 1987), que contribuyen a la represión de la expresión

del genoma viral. Sin embargo, la presencia de LAT en el genoma viral no es necesaria para el establecimiento de la latencia, ya que virus mutantes o deficientes en LAT son capaces de establecer latencia (Sawtell and Thompson, 1992). Por otra parte, estudios recientes han descrito la existencia de dos microRNA en la región que codifica para el transcrito LAT que desempeñan un papel importante en el ciclo de latencia-reactivación mediante la inhibición de la apoptosis y de la infección productiva (Shen y cols., 2009). La reactivación del virus, proceso en el que abandona el estado de latencia y se reactiva la transcripción de los genes iniciándose un nuevo ciclo replicativo, se produce por diferentes estímulos como el estrés físico y emocional, traumatismo, fiebre, radiación ultravioleta y drogas estimulantes, cursando la mayoría de ellos con inflamación (Halford y cols., 1996).

En la infección lítica, o tras el proceso de reactivación, el genoma viral se replica y se forman viriones maduros de novo los cuales son transportados de forma retrógrada hasta la membrana plasmática, saliendo de la neurona infectada. Estos viriones son liberados de la célula y pueden seguir tres posibles rutas: infectar a otras células nerviosas próximas en el ganglio; desplazarse al sitio de la infección primaria mediante un transporte anterógrado en el axón, dando lugar a las típicas llagas labiales o entrar en el sistema nervioso central donde también puede establecer latencia y sufrir reactivaciones que pueden producir daños neuronales.

La expansión del virus HSV-1 a las células vecinas se produce normalmente por la liberación de éste al espacio extracelular o a fluidos presentes en el entorno de las células epiteliales, como pueden ser la saliva y las lágrimas. Además, la propagación de HSV-1 también puede ocurrir directamente de célula a célula a través de las uniones intercelulares (Johnson and Huber, 2002). Probablemente, la difusión de los virus en el sistema nervioso se produce mediante este tipo de expansión, infectando a neuronas conectadas sinápticamente, lo que permite la rápida propagación del virus en el cerebro (LaVail y cols., 1990).

En los casos más agudos, la infección con HSV-1 puede producir encefalitis, una de las infecciones virales más graves del sistema nervioso central (Roizman, 1996). Esta afección provoca inflamación y muerte neuronal en las subregiones frontal y temporal del neocórtex y en el hipocampo (Ball, 1982). Aunque la encefalitis se puede desarrollar después de infecciones primarias o recurrentes, en la mayoría de los casos son debidas a una reactivación del virus del estado de latencia (Johnson, 1998).

2.2.3. HSV-1 Y LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

Numerosas evidencias tanto racionales como experimentales sugieren la posible etiología infecciosa de la EA y, en particular, la participación de HSV-1 (Dobson y cols., 2003). En este sentido, existen una serie de coincidencias que señalan a HSV-1 como un posible factor de susceptibilidad para la enfermedad: i) HSV-1 es un virus neurotrópico y prácticamente ubicuo en la población, lo que estaría en concordancia con la alta proporción de personas afectadas por la enfermedad; ii) las regiones cerebrales más afectadas durante la encefalitis herpética son la corteza frontal y temporal así como el hipocampo, las mismas zonas que muestran los principales cambios patológicos en la EA (Ball, 1986) y iii) tras la infección primaria, el virus puede permanecer en estado de latencia en el sistema nervioso durante toda la vida del individuo, explicando así la aparición de los síntomas en la edad avanzada (Itzhaki and Wozniak, 2008). Además, el proceso se vería facilitado por el deterioro del sistema inmune asociado al envejecimiento que favorecería las sucesivas reactivaciones del virus.

Posteriormente, han surgido evidencias experimentales que refuerzan esta asociación. En primer lugar, se descubrió la presencia de HSV-1 en el cerebro de un elevado porcentaje de pacientes de EA, y también en individuos controles de edad avanzada (Baringer and Pisani, 1994; Jamieson y cols., 1991; Rodriguez y cols., 2005). A continuación, se demostró la presencia de HSV-1 en regiones específicas del cerebro afectadas en los pacientes de EA (Jamieson y cols., 1992) y que el virus era capaz de reactivarse y causar lisis neuronal en cerebros de pacientes (Mori y cols., 2004), dando lugar a infecciones productivas que podrían causar neurodegeneración (Wozniak y cols., 2005).

Por otra parte, datos epidemiológicos revelaron que en individuos con HSV-1 en el cerebro, la frecuencia del alelo APOE- ϵ 4 es muy superior en pacientes de EA que en individuos controles (Itzhaki y cols., 1997). De esta forma se determinó que la presencia de HSV-1 en el cerebro en combinación con la posesión de al menos un alelo APOE- ϵ 4, es un fuerte factor de riesgo en la EA esporádica, mientras que estos factores por separado no incrementan el riesgo de padecer la EA (Dobson y cols., 2003; Lin y cols., 2002). Además, nuestro grupo de investigación ha establecido una relación funcional entre estos dos factores demostrando que la neuroinvasión de HSV-1 es dependiente de la dosis génica (Burgos y cols., 2002) y del genotipo de APOE, siendo APOE- ϵ 4 más eficiente que APOE- ϵ 3 en el acceso del virus al cerebro (Burgos y cols., 2003). También, se demostró que en modelos animales de infección aguda y latente con HSV-1, la carga viral en el cerebro de los ratones portadores del alelo APOE- ϵ 4 humano era mayor que en los portadores del alelo APOE- ϵ 3 (Burgos y cols., 2006).

Un tercer grupo de evidencias experimentales relacionan el virus HSV-1 con las dos principales características patológicas de la EA, la acumulación de A β y la hiperfosforilación de tau. En primer lugar, se ha demostrado que la infección con HSV-1 afecta a la generación del péptido A β , induciendo un incremento de los niveles de A β intracelulares en células neuronales y una acumulación del péptido A β 42 en cerebros de ratones infectados con HSV-1 (Wozniak y cols., 2007). Finalmente, en cerebros de pacientes de EA hay una localización mayoritaria del DNA viral en las placas seniles sugiriendo un papel del HSV-1 en la formación de la placa (Kammerman y cols., 2006; Wozniak y cols., 2009b). Por otra parte, HSV-1 causa la hiperfosforilación de tau, componente principal de los ovillos intraneuronales, en modelos celulares de infección (Wozniak y cols., 2009a; Zambrano y cols., 2008).

2.2.4. HSV-1 Y LA AUTOFAGIA.

La autofagia forma parte de la respuesta inmune innata del huésped para proteger a las células de patógenos intracelulares incluyendo bacterias (*Mycobacterium tuberculosis*, *Shigella flexneri*, *Salmonella* y *Streptococcus*) y virus (Sindbis virus, el virus del mosaico del tabaco, el parvovirus B19 y HSV-1) (Kirkegaard y cols., 2004). Este tipo de autofagia específica se ha denominado xenofagia. Se han descrito un gran número de virus capaces de inducir el proceso autofágico (Lee and Iwasaki, 2008), y ciertos virus RNA, como los picornavirus, coronavirus, el virus de la hepatitis murina y el virus de la influenza A, utilizan la maquinaria autofágica para facilitar su propia replicación y el ensamblaje viral (Espert y cols., 2007; Shoji-Kawata and Levine, 2009). Por lo tanto, la autofagia es un proceso que puede funcionar tanto como una vía antiviral como proviral.

Recientemente, se ha descrito que el HSV-1 también es capaz de modular el proceso autofágico a través de un mecanismo que implica a la proteína kinasa dependiente de RNA de doble cadena (PKR) y la fosforilación del factor de iniciación de la traducción 2 α (eIF2 α) (Talloczy y cols., 2002; Talloczy y cols., 2006). Tras la infección viral, se produce una activación de PKR que fosforila al factor eIF2 α induciendo una parada de la traducción proteica. Además, esta fosforilación también promueve la activación de la autofagia. Sin embargo, en modelos celulares, la infección con HSV-1 silvestre no estimula la actividad autofágica y, por el contrario, los mutantes de HSV-1 defectivos en la proteína ICP34.5 son capaces de incrementar la autofagia (Talloczy y cols., 2002). Esto es debido a que el factor de neurovirulencia ICP34.5 recluta y activa a la fosfatasa-1 α (PP1 α) induciendo la defosforilación de eIF2 α bloqueando así la inhibición de la traducción y la activación del proceso autofágico promovida por la eIF2 α quinasa PKR. Además, ICP34.5 también es responsable del bloqueo de la autofagia a través de la interacción con beclina 1, una proteína esencial en las primeras etapas de la autofagia,

causando su inactivación. Se ha demostrado que la inhibición de la beclina 1 es un evento crítico para la neurovirulencia de HSV-1 (Orvedahl y cols., 2007).

2.2.5. HSV-1 Y EL ESTRÉS OXIDATIVO.

Varios estudios han constatado que la infección, tanto aguda como latente, de HSV-1 en el cerebro está asociada con daño oxidativo (Milatovic y cols., 2002; Valyi-Nagy y cols., 2000). Sin embargo, los mecanismos moleculares que conducen al daño oxidativo durante la infección de HSV-1 son desconocidos. En modelos celulares, la infección con HSV-1 causa un daño celular a través de la peroxidación de lípidos (Palu y cols., 1994) e induce la producción de óxido nítrico en monocitos y macrófagos diferenciados (Lopez-Guerrero and Alonso, 1997). Durante la fase aguda en modelos murinos de infección, los ratones infectados con HSV-1 desarrollan encefalitis acompañada de una severa inflamación y niveles elevados de F4-neuroprostanos y F4-isoprostanos, marcadores ambos de daño oxidativo en el cerebro (Milatovic y cols., 2002). Además, estudios en modelos murinos de infección latente con HSV-1, demuestran la existencia de daño oxidativo en moléculas de RNA y DNA en las áreas infectadas del cerebro (Valyi-Nagy y cols., 2000).

Recientemente, estudios en modelos celulares revelaron que la infección con HSV-1 incrementa los niveles de ROS y que las células de la microglía son la principal fuente de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en el cerebro durante la encefalitis herpética (Kavouras y cols., 2007). Por otra parte, la infección latente de HSV-1 en modelos murinos también está asociada con una inflamación persistente y crónica en el cerebro, y con elevados niveles de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral α (TNF α) y una actividad incrementada de iNOS. Estos factores pueden desempeñar un papel importante en la prevención de la reactivación de HSV-1 (Koprowski y cols., 1993; Marques y cols., 2008; Meyding-Lamade y cols., 1998). Tanto el TNF α como el óxido nítrico tienen actividad antiviral pero pueden generar directamente potentes radicales libres o daño oxidativo mediado por ROS a través de distintas rutas de señalización celular. De esta forma, la respuesta inmune e inflamatoria del huésped tiene un papel importante en la generación del daño oxidativo en el cerebro durante la infección con HSV-1 (Valyi-Nagy and Dermody, 2005).

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Las causas y los mecanismos patogénicos de la EA esporádica aún no están elucidados aunque se ha descrito que la acumulación del péptido A β y fallos en las etapas finales de la autofagia son dos eventos característicos en cerebros de pacientes de la EA. En los últimos años se han acumulado numerosas evidencias de la implicación del estrés oxidativo y la infección del cerebro con HSV-1 en la patogénesis. Así, con el fin de investigar el papel del HSV-1 en la patogénesis de la EA, nos propusimos estudiar los efectos del HSV-1 sobre la aparición de eventos asociados a la neurodegeneración, enfocando el estudio principalmente en la inducción de un proceso autofágico y las alteraciones del procesamiento proteolítico del APP, en modelos celulares de infección. También analizaremos si la infección con HSV-1 y el estrés oxidativo subyacente al envejecimiento pueden actuar de manera conjunta para producir la neurodegeneración característica de la EA.

Para llevar a cabo estos estudios, nos planteamos los siguientes objetivos experimentales:

1. Estudio de la modulación de la autofagia en distintos modelos celulares de infección con HSV-1. Análisis de la implicación funcional de la autofagia en la progresión del ciclo viral.
2. Estudio de la proteólisis de la proteína APP y la biología del péptido A β en células de neuroblastoma humano que expresan establemente APP infectadas con HSV-1.
3. Análisis del papel de la autofagia en las alteraciones del procesamiento proteolítico de la proteína APP inducidas por la infección con HSV-1.
4. Estudio del efecto del estrés oxidativo en la aparición de los marcadores de neurodegeneración inducidos por HSV-1.

MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1. REACTIVOS.

Etanol, metanol, ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA), Tween-20, cloruro sódico, cloruro cálcico, cloruro magnésico, cloruro potásico, hidróxido sódico, hidróxido potásico, paraformaldehído, dihidrogenofosfato potásico, ácido clorhídrico, bicarbonato sódico, acrilamida, bis-acrilamida, isopropanol, glicina y glicerol fueron suministrados por Merck.

Glucosa, rojo Ponceau, albúmina de suero bovina (BSA), dimetilsulfóxido (DMSO), HEPES, dietilpirocarbonato (DEPC), β -mercaptoetanol, azul de bromofenol, Tritón X-100, deoxicolato sódico, ditioneitol (DTT), dodecil sulfato sódico (SDS), tris, ortovanadato sódico y fluoruro sódico fueron suministrados por Sigma.

El cocktail de inhibidores de proteasas, PMSF, pepstatina A, leupeptina, Tripure, aprotinina y DNasa I fueron suministrados por Roche.

La N, N, N', N'- Tetrametiletilendiamina (TEMED) y persulfato amónico (APS) fueron suministrados por Bio-Rad.

El Mowiol® 40-88 fue suministrado por Aldrich, el reactivo BCA por Pierce y el Nonidet P40 (NP-40) por Fluka y la leche desnatada en polvo fue suministrada por Central Lechera Asturiana.

Además de los reactivos mencionados se han utilizado otros más específicos cuya procedencia se indica en el texto.

4.2. SONDAS FLUORESCENTES.

- **Dihidrocloruro de 4', 6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI):** El DAPI (Sigma) es un agente fluorescente, permeable en la membrana, que se une de forma reversible al surco menor del DNA de doble cadena, formando un complejo estable cuya fluorescencia es 20 veces mayor que la del DAPI no unida a DNA. El DAPI unido a DNA se excita a una longitud de onda de 364 nm y emite a una longitud de onda de 454 nm. Fue solubilizado en agua a una concentración de 5 mg/ml y se utilizó a una concentración final de 5 μ g/ml.

- **Sondas Taqman-MGB®:** Estas sondas contienen una marca emisora de fluorescencia en el extremo 5', mientras que en el extremo 3' poseen un captador de fluorescencia (*quencher*) no fluorescente. Además contienen otra modificación denominada MGB (*minor groove-binder*) que se une al surco menor del DNA favoreciendo la consecución de la PCR. Durante la reacción,

la ruptura de la sonda provoca la separación de la marca emisora y del captador, lo que aumenta la intensidad de la fluorescencia (Gelmini y cols., 1997).

4.3. ANTICUERPOS.

4.3.1. ANTICUERPOS UTILIZADOS EN LA CARACTERIZACIÓN DE LA INFECCIÓN.

- **Anti-HSV-1:** anticuerpo policlonal de conejo (DAKO) que reconoce la mayoría de las glicoproteínas presentes en la envuelta viral y varias proteínas de la cápsida.

- **Anti VP16:** anticuerpo policlonal de conejo (Sigma) que reconoce VP16, una proteína del tegumento de HSV-1.

- **Anti-ICP4:** anticuerpo monoclonal de ratón (Abcam) que reconoce la proteína inmediatamente temprana ICP4 de HSV-1.

- **Anti-gC:** anticuerpo monoclonal de ratón (Abcam) que reconoce gC, una glicoproteína de la envuelta de HSV-1.

4.3.2. ANTICUERPOS UTILIZADOS EN LA CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO AUTOFÁGICO.

- **Anti-LC3B:** anticuerpo policlonal de conejo (Sigma) que reconoce un epítipo de la región interna de la proteína LC3 humana.

- **Anti-MAPLC3:** anticuerpo policlonal de cabra (Santa Cruz Biotechnology) que reconoce un epítipo de la región interna de la proteína LC3 humana.

- **Anti-LC3:** anticuerpo policlonal de conejo (MBL) que reconoce la proteína LC3 humana.

4.3.3. ANTICUERPOS QUE RECONOCEN LA PROTEÍNA APP Y EL PÉPTIDO A β .

- **Anti-Alzheimer precursor protein A4 (clon 22C11):** anticuerpo monoclonal de ratón (Millipore) que reconoce un epítipo N-terminal, correspondiente a los aminoácidos 66-81, de la proteína APP humana.

- **Anti-APP (C-terminal):** anticuerpo policlonal de conejo (Sigma) que reconoce un epítipo en el extremo C-terminal del APP humano.

- **Anti-A β (6E10):** anticuerpo monoclonal purificado de ratón (Signet) que reconoce los residuos 1-16 de la secuencia de A β humano.

- **Anti-A β (4G8)**: anticuerpo monoclonal purificado de ratón (Sigma) que reconoce los residuos 17-24 de la secuencia de A β humano.

- **Anti-A β (4-10) (WO-2)**: anticuerpo monoclonal de ratón (Genetics) que reconoce los residuos 4-10 de la secuencia de A β humano.

- **Anti-A β 40**: anticuerpo policlonal de conejo (Biosource) que reconoce el péptido A β 40.

- **Anti-A β 40 (R208)**: anticuerpo policlonal de conejo que reconoce el péptido A β 40. El anticuerpo fue amablemente cedido por el Dr. P. D. Mehta, del State Institute for Basic Research de Nueva York.

- **Anti-A β 42 (R226)**: anticuerpo policlonal de conejo que reconoce el péptido A β 42. El anticuerpo fue amablemente cedido por el Dr. P. D. Mehta, del State Institute for Basic Research de Nueva York.

4.3.4. OTROS ANTICUERPOS.

- **Anti Lamina A/C**: anticuerpo monoclonal de ratón (BD Transduction Laboratories) que reconoce las proteínas humanas de la envoltura nuclear lamina A/C.

- **Anti-GFP**: anticuerpo policlonal de conejo (Invitrogen) que reconoce la proteína verde fluorescente (GFP).

- **Anti-tubulina**: anticuerpo monoclonal de ratón, clon B-5-1-2 (Sigma), que reconoce un epítipo del extremo C-terminal de la isoforma α de la tubulina.

- **Anti-CD63 (H5C6)**: anticuerpo monoclonal de ratón (Development Studies Hybridoma Bank) que reconoce la proteína lisosomal CD63 humana.

- **Anti-p62/SQSTM1**: anticuerpo policlonal de conejo (Sigma) que reconoce un epítipo C-terminal de la proteína p62/SQSTM1.

- **Anti-EEA1**: anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce el antígeno endosomal temprano 1 (EEA1).

- **Anti-CD222**: anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce el marcador endosomal tardío CD222.

Las aplicaciones y diluciones de uso de cada anticuerpo están reflejadas en la Tabla 1:

Anticuerpo	Inmunofluorescencia/ Confocal	Western-Blot
Anti-HSV-1	1/1000	1/5000
Anti-VP16	1/1000	-----
Anti-ICP4	1/200	1/1000
Anti-gC	1/1000	1/5000
Anti-LC3B	-----	1/500
Anti-MAPLC3	1/100	-----
Anti-LC3	1/100	-----
Anti-APP (22C11)	1/200	1/4000
Anti-APP (C-terminal)	1/100	1/2000
Anti-A β (6E10)	1/100	1/500
Anti-A β (4G8)	1/100	-----
Anti-A β (WO-2)	-----	1/1000
Anti-A β 40	1/100	-----
Anti-A β ₄₀ (R208)	1/200	-----
Anti-A β ₄₂ (R226)	1/200	-----
Anti-Lamina A/C	-----	1/1000
Anti-GFP	-----	1/1000
Anti-tubulina	-----	1/20000
Anti-cd63	1/200	-----
Anti-p62/SQSTM1	1/100	-----
Anti-EEA1	1/200	-----
Anti-CD222	1/100	-----

4.3.5. ANTICUERPOS SECUNDARIOS.

En inmunofluorescencia y microscopía confocal se utilizaron los siguientes anticuerpos:

- **Anticuerpos marcados con Alexa Fluor 488** que reconocen las inmunoglobulinas IgG (H+L) de ratón y conejo (Invitrogen). Se utilizaron a una dilución 1:1000.

- **Anticuerpos marcados con Alexa Fluor 555** que reconocen las inmunoglobulinas IgG (H+L) de ratón, conejo y cabra (Invitrogen). Se utilizaron a una dilución 1:1000.

En los ensayos de inmunomarcado después de transferencia proteica (Western-blot) se utilizaron los siguientes anticuerpos:

- **Anti inmunoglobulina de ratón acoplado a peroxidasa** (Vector Laboratories): dilución utilizada para inmunotransferencia proteica 1/50000.

- **Anti inmunoglobulina de conejo acoplado a peroxidasa** (Nordic): dilución utilizada para inmunotransferencia proteica 1/25000.

4.4. MÉTODOS DE TRANSFECCIÓN.

4.4.1. PRECIPITACIÓN CON FOSFATO CÁLCICO. Se realizó de acuerdo con el método descrito con pequeñas modificaciones (Sambrook, 1989). Muy brevemente, a 1.5 µg de DNA plasmídico, disuelto en 23.5 µl de agua se le añadió suavemente 2.5 µl de Cl_2Ca 2.5M. Esta mezcla se aplicó gota a gota sobre 25.5 µl de tampón HBS 2x (NaCl 200mM, KCl 10mM, Na_2HPO_4 1.5mM, glucosa 12 mM, HEPES 50 mM pH 7) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después, la mezcla se añadió sobre las células y se incubó 6 horas tras las que se cambió el medio de cultivo por medio fresco y se dejaron las células entre 16 y 24 horas.

4.4.2. LIPOFECTAMINA. La transfección con el reactivo lipofectamina se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen™). Brevemente, se sembraron 8×10^5 células SK-N-MC en M-6. Transcurridas 24 horas, se diluyeron el DNA y el reactivo lipofectamina (relación 1:4) en Opti-MEM®. Tras 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, se añadió la mezcla de transfección a cada pocillo y se incubó toda la noche. Al día siguiente, se cambió el medio de transfección por medio fresco y se dejaron las células entre 16 y 24 horas para tratamientos posteriores.

4.4.3. NUCLEOFECCIÓN. Los experimentos se llevaron a cabo utilizando la tecnología Nucleofector de Amaxa biosystems (Cologne, Germany), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se resuspendieron 4×10^6 células SK-N-MC en un volumen final de 100 µl de tampón Nucleofector® y se añadieron 15 µg de DNA. A continuación, las muestras fueron transferidas a las cubetas de nucleofección y transfectadas con el programa adecuado para las células SK-N-MC (C009). Finalmente, las células fueron sembradas en las placas de cultivo adecuadas según el experimento.

4.5 LÍNEAS CELULARES.

En este trabajo se han empleado las siguientes líneas celulares:

- SK-N-MC: línea celular establecida de neuroblastoma humano suministrada por la ATCC (American Type Culture Collection) ATCC No. HTB-10.

- SK-LC3: células SK-N-MC que expresan establemente el marcador de autofagosomas LC3 como proteína de fusión GFP-LC3.

- SK-APP: células SK-N-MC que expresan establemente la isoforma de APP de 695 aminoácidos, generadas en nuestro laboratorio (Recuero y cols., 2004). Se emplearon dos líneas celulares, SK-C2 y SK-C3 con distintos niveles de sobreexpresión.

Todas estas células se crecieron en monocapa sobre placas de cultivo en medio de Eagle modificado (MEM) suplementado con suero fetal bovino (FCS) al 10% descomplementado durante 30 minutos a 56°C, glutamina (2mM), piruvato sódico (1mM) aminoácidos no esenciales (alanina, aspártico, glutamina, prolina y asparragina) y una mezcla de antibióticos (Estreptomicina y Penicilina G).

- HEK 293 A: línea celular humana de epitelio embrionario de riñón que expresa las proteínas E1 adenovirales, suministrada por Invitrogen™.

- Hela: línea celular humana procedente de un adenocarcinoma del epitelio del útero suministrada por la ATCC. ATCC No. CCI-2.

- Vero: línea celular de epitelio de riñón de mono verde africano suministrada por la ATCC. ATCC No. CCL-81.

Las células se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) conteniendo FCS al 10% descomplementado durante 30 minutos a 56°C, glutamina (2 mM), aminoácidos no esenciales, piruvato sódico (1mM) y gentamicina.

Las células se cultivaron a 37°C en una atmósfera humificada con CO₂ al 7%.

4.6. GENERACIÓN DE HERRAMIENTAS PARA LA MONITORIZACIÓN DE LA AUTOFAGIA.

4.6.1. GENERACIÓN DE UNA LÍNEA CELULAR ESTABLEMENTE TRANSFECTADA QUE EXPRESA LA PROTEÍNA DE FUSIÓN GFP-LC3.

Las células SK-N-MC cultivadas en una placa P100 al 80% de confluencia se transfectaron con el plásmido de expresión GFP-LC3 (pEGFP-LC3, cedido amablemente por el Dr. N. Mizushima del National Institute for Basic Biology, Osaka, Japón y Dr. T. Yoshimori del Research Institute for Microbial Diseases, Osaka, Japón) (Kabeya y cols., 2000), mediante el método de precipitación con fosfato cálcico (Sambrook, 1989) durante 15 horas. Pasado este tiempo, se substituyó el medio por medio completo y, 6 horas después, las células fueron sometidas a las diluciones 1:2, 1:10, 1:100 y 1:1000 sobre placas P100. Cumplidas 24 horas, las células que expresaban GFP-LC3 fueron seleccionadas por el tratamiento con el antibiótico geneticina. Se realizaron cambios de medio cada 3 ó 4 días, añadiendo siempre el antibiótico de selección. Las colonias seleccionadas fueron expandidas y la expresión de la proteína de fusión GFP-LC3 fue analizada por microscopía de fluorescencia, así como por Western Blot (WB). Aquellas colonias que sobreexpresaban una mayor cantidad de la proteína, fueron crecidas y establecidas como líneas celulares. Finalmente, se seleccionó una colonia y la línea celular establecida se denominó SK-LC3.

4.6.2. GENERACIÓN DE UN ADENOVIRUS QUE EXPRESA UN RNA INTERFERENTE ESPECÍFICO DE *ATG5* HUMANO.

El adenovirus Ad-shATG5 fue generado usando el kit BLOCK-it™ adenoviral RNAi expression system (Invitrogen™) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para ello, se diseñó un oligonucleótido interferente (shATG5) correspondiente a la región codificante 63-83 respecto al codón de iniciación del gen *ATG5* (Nº de acceso de GenBank BC002699). Se construyó un vector que expresaba el shATG5 bajo el control del promotor U6 mediante la inserción de pares de oligonucleótidos de DNA anillados en el vector pENTR™/U6 linearizado (Invitrogen™). Posteriormente, el cassette U6-shATG5 clonado en el vector donador pENTR™/U6 fue transferido al vector adenoviral aceptor pAd/BLOCK-iT™-DEST para generar el vector pAd-shATG5. A continuación, se transfectaron células HEK 293 A con el plásmido pAd-shATG5 utilizando el reactivo lipofectamina™ con el fin de conseguir una preparación adenoviral cruda. Posteriormente, el sobrenadante conteniendo adenovirus que expresan el shATG5 (Ad-shATG5) fue amplificado mediante infección de células HEK 293 A. Los títulos de los adenovirus generados fueron determinados mediante ensayos de titulación en placa en la línea celular HEK 293 A. Se usó como control negativo un adenovirus que expresa

un shRNA específico para el gen *lamina A/C* (Ad-shLAM), incluido en el kit BLOCK-iT™ adenoviral RNAi expression system (Harborth y cols., 2001).

4.7. VIRUS E INFECCIÓN.

Para todos los experimentos realizados en este trabajo se utilizó la cepa KOS 1.1 del virus HSV-1, amablemente cedida por el Dr. L. Carrasco del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” de Madrid. El HSV-1 fue cultivado, propagado y titulado sobre monocapa de células Vero, en un laboratorio de nivel de bioseguridad 2 (P2) y fue almacenado posteriormente a -70°C.

Para algunos experimentos, también se ha utilizado un Sindbis virus que expresa la proteína GFP como marcador, amablemente cedido por el Dr. Jose Antonio Esteban (Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”. Madrid. España) (Gerges y cols., 2005).

4.7.1. INFECCIÓN CON HSV-1.

Las células fueron infectadas a diferentes multiplicidades de infección (moi) durante diferentes tiempos como se indica en cada experimento. La infección se llevó a cabo en medio MEM sin FCS durante 1 hora, para permitir la adsorción del virus y, posteriormente, las células se dejaron en medio MEM completo con 2% FCS durante el resto de la infección. Alternativamente, la infección también se efectuó en medio MEM al 10% FCS tras comprobar que la presencia de FCS no afectaba a la eficiencia de la infección. Los experimentos de infección se llevaron a cabo en placas de 24 pocillos (M-24) con cubreobjetos para los ensayos de inmunofluorescencia y en placas de 6 pocillos (M-6) para los ensayos de WB.

En los experimentos de infección con el virus Sindbis, las células SK-APP fueron infectadas a 37°C durante 18 ó 48 horas.

4.7.2. TITULACIÓN DE MUESTRAS INFECTADAS.

La infectividad del HSV-1 se valoró mediante el recuento de placas de lisis en monocapa de células Vero en medio semisólido (DMEM con 2% FCS y agar al 0.7%), optimizando un método descrito previamente (Carrascosa y cols., 1982). Brevemente, las células Vero se crecieron en placas M-24 hasta preconfluencia en medio DMEM suplementado con 10% de FCS y gentamicina. A estas células, se les añadió una alícuota del lisado celular, para el título del virus intracelular, o del medio de cultivo de las células, para el título del virus extracelular. Se realizaron diluciones seriadas de orden 10 de las muestras recogidas y se añadieron sobre la monocapa de células VERO (150 µl por pocillo) tras retirar el medio de cultivo. Después de una

hora de adsorción, se añadió 1 ml por pocillo de medio semisólido y se dejaron incubar a 37°C. Las placas se revelaron a las 48 horas post-infección (h.p.i), por tinción con cristal de violeta 1% en formaldehído al 5% durante toda la noche. Después de lavar con agua, se procedió al recuento de las placas de lisis. El título del virus se expresa en unidades formadoras de placa (ufp) por ml.

4.8. TRATAMIENTOS.

- **3-Metiladenina (3-MA).** La 3-MA es un inhibidor de la fosfoinositol 3 quinasa (PI3K) de clase III, y se utiliza como inhibidor del proceso autofágico. Se obtuvo de Sigma y se solubilizó en agua a 10 mg/ml. La concentración final utilizada fue de 10 mM.

- **Ácido fosfonoacético (PAA).** El PAA es un inhibidor específico de la DNA polimerasa viral, que inhibe el paso de elongación de la síntesis de DNA. Se obtuvo de Sigma y se solubilizó en agua a una concentración de 40 mg/ml. La concentración final utilizada fue de 400 µg/ml.

El tratamiento con PAA se realizó incubando las células infectadas con el inhibidor después de la hora de adsorción viral y manteniéndolo hasta el final de la infección.

- **Brefeldina A.** La brefeldina A es un agente que bloquea el transporte de proteínas entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, inhibiendo la secreción de proteínas. Se obtuvo de Sigma y se solubilizó en etanol a 5 mg/ml. La concentración final utilizada fue de 5 µg/ml.

- **Cicloheximida (CHX).** Inhibidor de la síntesis de proteínas. Se obtuvo de CALBIOCHEM. Se solubilizó en metanol a una concentración de 10 mg/ml y la concentración final utilizada fue de 10 µg/ml.

- **Cloruro amónico (NH₄Cl).** Agente alcalinizante que neutraliza el pH lisosomal. Se obtuvo de Merck y se solubilizó en agua a 2 M. La concentración final utilizada fue de 20 mM.

- **Earle's balanced salt solution (EBBS).** La privación nutricional se simuló incubando las células con EBBS durante los tiempos indicados en cada experimento.

- **Heparina.** Análogo estructural del heparán sulfato con el que se consigue reducir la eficiencia de la infección. Se obtuvo de Sigma. Fue solubilizado en agua a una concentración de 1 mg/ml y se utilizó a una concentración final de 10 µg/ml.

El tratamiento se realizó incubando las células con la heparina durante la hora de adsorción viral. La droga se repuso al realizar el cambio de medio y se mantuvo hasta el final de la

infección.

- **Leupeptina.** La leupeptina es un inhibidor de las serina y tiol proteasas lisosomales. Se obtuvo de Roche y se solubilizó en agua a 10 mM. La concentración final utilizada fue de 0.1 mM.

- **Rapamicina.** La rapamicina es un activador de la autofagia. Se obtuvo de Sigma y se solubilizó en DMSO a 10 mg/ml. La concentración final utilizada fue de 0.2 µg/ml.

- **Xantina-Xantina oxidasa (XXO).** Con el fin de inducir estrés oxidativo, los cultivos celulares fueron incubados simultáneamente con xantina (10 µM) y xantina oxidasa (50 miliunidades/ml) durante los tiempos indicados en cada experimento.

4.9. PREPARACIÓN DE MUESTRAS CELULARES.

4.9.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS TOTALES DE PROTEÍNAS.

Las células se recogieron de la placa de cultivo y se lavaron con PBS por centrifugación a 800 x g durante 5 minutos. El lisado celular se obtuvo resuspendiendo el sedimento celular en tampón de lisis RIPA (NaCl 150mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.5, NP-40 1%, SDS 0.1%, desoxicolato sódico 0.2%) suplementado con un cocktail de inhibidores de proteasas a una concentración de 25 x 10⁶ células/ml de tampón. Los lisados se incubaron a 4°C durante 30 minutos y se centrifugaron a 12000 x g en una microcentrífuga durante 15 minutos a 4°C. Se recogió el sobrenadante con las proteínas solubilizadas por el tampón de lisis y se congeló a -20°C hasta su utilización, separando una alícuota para valorar la concentración de proteínas.

Para el análisis de la proteína LC3 endógena, el lisado celular se obtuvo resuspendiendo el sedimento celular en un tampón de lisis conteniendo NaCl 400 mM, Tris-HCl 50 mM pH7.6, SDS 1%, EGTA 1 mM y EDTA 1 mM. Los lisados se incubaron durante 15 minutos a 95°C en agitación y posteriormente se centrifugaron a 12000 x g en una microcentrífuga durante 15 minutos a 4°C. Se recogió el sobrenadante con las proteínas solubilizadas por el tampón de lisis y se congeló a -20°C hasta su utilización, separando una alícuota para valorar la concentración de proteínas.

4.9.2. MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS.

La cuantificación de la concentración de proteínas de los lisados celulares se realizó mediante el método BCA (Pierce), utilizando como patrón diluciones seriadas de albúmina de suero bovina (BSA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.9.3. OBTENCIÓN DE MEDIOS CONDICIONADOS DE LOS CULTIVOS CELULARES.

El medio condicionado (10 ml de medio por placa P100 ó 2 ml de medio por pocillo de placa M-6) se centrifugó a 800 x g durante 5 minutos. Los sobrenadantes obtenidos suplementados con un cocktail de inhibidores de proteasas fueron concentrados 10 veces mediante liofilización y reconstituidos en tampón PBS 1x. Posteriormente, se congelaron a -70°C hasta su utilización.

4.10. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS.

4.10.1. INMUNOMARCADO DESPUÉS DE ELECTROTRANSFERENCIA PROTEICA (WESTERN-BLOT).

4.10.1.1. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE).

La electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS se realizó según el método discontinuo de Laemmli (Laemmli, 1970). Se utilizaron geles concentradores del 3% y geles separadores de poliacrilamida de porcentaje variable en función del peso molecular de las proteínas a analizar. Como tampón de muestra se utilizó Tris-HCl 25mM pH 6.3, glicerol 10%, SDS 2%, β -mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol 0.01%. Como patrones de peso molecular se utilizaron los marcadores preteñidos Precision Plus Protein™ Standards de Bio-Rad (250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 y 10 kDa).

4.10.1.2. Electrotransferencia proteica.

Las proteínas resueltas en geles de poliacrilamida-SDS se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) con un tamaño de poro de 0.45 μ m con una corriente de 5.5 mA/cm² mediante el método de transferencia electroforética semi-seca. Para el WB de la proteína LC3 endógena, las proteínas se transfirieron a una membrana de Immobilon (Millipore) con un tamaño de poro de 0.2 μ m, previamente activada con metanol durante un minuto, mediante el método de transferencia electroforética líquida con una corriente de 1.7 mA/cm² durante toda la noche. Después de visualizar las proteínas transferidas mediante la tinción con rojo Ponceau S, se saturó la membrana durante toda la noche a 4°C en PBS-leche 5% Tween-20 0.5% o en PBS-BSA 3% y Tween-20 0.5%, según el anticuerpo con objeto de bloquear uniones inespecíficas.

4.10.1.3. Inmunodetección y revelado.

La membrana de nitrocelulosa o Immobilon se incubó con los distintos anticuerpos primarios a las diluciones adecuadas en tampón de dilución de anticuerpo (PBS-leche 1% y Tween-20 al 0.1% o PBS-BSA 1% y Tween-20 al 0.1% según el anticuerpo utilizado) durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó la membrana 3 veces con tampón de lavado (PBS-Tween-20 0.05%) y se incubó 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario adecuado unido a POD, diluido 1:50.000 en tampón de dilución de anticuerpo. Tras tres lavados con tampón de lavado, la señal de los anticuerpos se reveló utilizando el reactivo quimioluminiscente intensificado ECL (Amersham Bioscience). Posteriormente, se cuantificó la intensidad las bandas resultantes mediante densitometría (densitómetro GS-710 “Calibrated Imaging Densitometer” de BioRad).

4.10.2. INMUNOCITOQUÍMICA.

Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos sin tratar. La fijación de las células se realizó con paraformaldehído al 4% en tampón fosfato durante 20 minutos. Posteriormente, las células se lavaron 3 veces con PBS durante 5 minutos. Después de ser fijadas, las células se permeabilizaron y bloquearon durante toda la noche a 4°C con una solución de bloqueo compuesta por 0.2% Tritón X-100 y 2% suero de caballo en PBS (pH 7.4). Pasado este tiempo, se incubaron con el primer anticuerpo, diluido en solución de bloqueo, durante 1 hora y media a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron 3 lavados con solución de bloqueo de 10 minutos cada uno y se añadieron los anticuerpos secundarios acoplados a Alexa 488 y 555 (diluidos en solución de bloqueo) durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido el tiempo de incubación se hicieron 3 lavados de 10 minutos en PBS y se incubaron los cubreobjetos con DAPI (5 µg/ml) durante 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, para realizar la tinción de los núcleos. Posteriormente, se lavaron los cubreobjetos con agua y se deshidrataron de forma gradual con etanol al 25%, 50%, 75% y 100%. Los cubreobjetos, una vez deshidratados, se montaron sobre portaobjetos con medio de montaje para fluorescencia Mowiol® (Sigma).

Las muestras se visualizaron en un microscopio invertido de fluorescencia Zeiss Axiovert200, utilizando objetivos de 63x y 100x. Para el análisis confocal de las muestras se utilizó un microscopio de Barrido Láser confocal LSM510 META acoplado a un microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss), utilizando objetivos de 63x y 100x

Para adquirir las imágenes se utilizó una cámara SPOT RT Slider (Diagnostic), empleando el Software Metavue. El procesamiento de las imágenes se realizó utilizando el programa Adobe

PhotoShop CS3.

4.10.3. ENSAYO ELISA PARA CUANTIFICACIÓN DEL PÉPTIDO A β SECRETADO E INTRACELULAR.

Para los ensayos de ELISA, las células SK-C2 o SK-C3 fueron infectadas con HSV-1 y se cuantificaron los niveles de A β 40 y A β 42 en los medios condicionados y en los lisados celulares mediante un kit de ELISA sándwich comercial (Biosource), según el protocolo del fabricante. Brevemente, se preparó la curva patrón de A β 40 y A β 42 a partir de una solución de A β 40 y A β 42 a concentraciones conocidas. El medio condicionado fue tratado con inhibidores de proteasas y concentrado 10 veces. Los lisados se obtuvieron a partir de células resuspendidas en tampón de lisis (0.5% Tritón X-100, 2.5 mM EDTA en PBS) y sonicadas durante 30 segundos. Posteriormente, se incubaron las muestras en placas de ELISA preadsorbidas con un anticuerpo monoclonal de ratón específico para el extremo N-terminal de A β (anticuerpo de captura), y, a continuación, con un anticuerpo de conejo que reconoce específicamente el péptido A β 40 o el péptido A β 42. Posteriormente, se incubó con un anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa que produce una señal colorimétrica. Se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm transcurridos 30 minutos. Se calcularon los valores absolutos de las muestras por extrapolación a partir de la recta patrón, expresados en picogramos de A β 40 y A β 42 por ml de medio incubado o por miligramo de proteína. Los datos fueron analizados estadísticamente con un test de Student desapareado de dos colas.

4.11. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

Se llevó a cabo una fijación de las células en placa para una inclusión convencional. Para ello, las células fueron fijadas en la placa de cultivo en tampón fosfato 0.1 M pH 7.4 conteniendo paraformaldehído 4% + glutaraldehído 2% durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron 3 lavados de 10 minutos en tampón fosfato 0.1 M pH 7.4. Posteriormente, se fijaron de nuevo las células en tetróxido de osmio 1% conteniendo ferrocianuro potásico 1% en agua durante una hora a 4°C. Después de 3 lavados durante 5 minutos en agua destilada, las células se incubaron en tampón fosfato 0.1 M pH 7.4 conteniendo ácido tánico 0.15 %. Después de 3 lavados con agua destilada, las células se incubaron con acetato de uranilo 2% en agua durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. A continuación, se llevó a cabo la deshidratación de las muestras en un gradiente de etanol (50%-100%) y su inclusión en Epón completo durante dos días a 60°C. Después de seleccionar al microscopio óptico áreas de 3-4 mm, se vuelven a polimerizar sobre bloque de Epon y son cortadas en secciones de 70 nm de grosor. Finalmente, se examinaron las muestras en un microscopio electrónico Jeol 1010.

4.12. ENSAYO DE ACTIVIDADES α -, β -, Y γ -SECRETASAS.

Las actividades α -, β - y γ - secretasas se determinaron usando un ensayo comercial fluorescente siguiendo las instrucciones del fabricante (R&D Systems, Inc). La actividad secretasa se testó mediante la adición de un péptido específico para la correspondiente actividad secretasa conjugado con las moléculas marcadoras EDANS y DABCYL, de forma que la proteólisis del péptido por la secretasa separa ambas moléculas marcadoras permitiendo la emisión de fluorescencia. El nivel de actividad enzimática secretasa del cultivo es proporcional a la reacción fluorimétrica. Brevemente, se lisaron 5×10^6 SK-N-MC o SK-APP en 100 μ l de tampón de extracción. Después de 30 minutos de incubación en hielo, se centrifugaron los extractos a $13000 \times g$ durante 1 minuto. Posteriormente, se cuantificó la concentración de proteína de los lisados mediante el método BCA. A continuación, se mezclaron 100 μ g de los lisados celulares (en un volumen de 50 μ l) con el tampón de reacción 2x y el péptido fluorescente. Se incubaron las placas a 37°C en la oscuridad durante 2 horas y se registró la fluorescencia en un fluorímetro de placa Infinite® 200 (Tecan Trading AG).

4.13. ENSAYO DE DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS DE VIDA MEDIA LARGA.

Se sembraron células SK-N-MC en placas M-24 y se incubaron en medio con 60 μ M de leucina no marcada y ^3H -leucina (1 μ Ci/ml) durante 24 horas. Posteriormente, se lavaron las células con PBS para eliminar la leucina no incorporada y se incubaron en medio con 2 mM leucina no marcada durante 24 horas para permitir la degradación de las proteínas de vida media corta. Posteriormente, las células fueron tratadas con distintos estímulos y/o infectadas con HSV-1 a distintas moi durante diferentes tiempos. Transcurrido este tiempo, se recogió una alícuota del sobrenadante y se sometió a precipitación con ácido tricloroacético (TCA) mediante la adición de TCA al 10%. A continuación, se centrifugaron los sobrenadantes durante 10 minutos a $12000 \times g$ y se midió la radiactividad soluble correspondiente a los aminoácidos resultantes de la degradación con un contador de centelleo. En paralelo, las células se fijan en TCA al 10% durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, las muestras celulares se solubilizaron con NaOH 0.2 N/0.4 % desoxicolato sódico y, finalmente, se midió la radiactividad celular con un contador de centelleo. Se calculó la degradación de proteínas como el porcentaje de la radiactividad soluble en TCA del medio de cultivo respecto a la radiactividad total (radiactividad soluble + radiactividad insoluble de las células).

4.14. ENSAYO DE SECRECIÓN DE PROTEÍNAS.

Los niveles de secreción de proteínas se determinaron usando un ensayo comercial luminiscente (*Gaussia* Luciferase Assay Kit) siguiendo las instrucciones del fabricante

(BioLabs, Inc). Este ensayo se basa en las propiedades de la enzima luciferasa de *Gaussia princeps* (GLuc), que es naturalmente secretada tras su síntesis (Badr y cols., 2007). Esta luciferasa, que no requiere ATP, cataliza la oxidación del sustrato coelenterazina en una reacción que emite luz (470 nm). Brevemente, se transfectó el plásmido control pCMV-Gluc, que contiene la secuencia “humanizada” codificante para la luciferasa secretada, en células SK-N-MC y SK-APP. Transcurridas 24 horas, las células fueron infectadas con HSV-1 durante distintos tiempos. Posteriormente, se mezcla 1 µl del medio condicionado de la muestra con el tampón de reacción y el sustrato y se transfirió a una placa M-96. Finalmente, se registró la luminiscencia en un luminómetro de placa Infinite® 200 (Tecan Trading AG). El nivel de actividad enzimática luciferasa del sobrenadante del cultivo es proporcional a la reacción lumínica, y por tanto, a los niveles de la proteína reportera GLuc secretada.

4.15. CUANTIFICACIÓN DE DNA MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

4.15.1. EXTRACCIÓN DE DNA.

Las células infectadas se recogieron de la placa y se lavaron con PBS por centrifugación a 800 x g durante 5 minutos. La extracción del DNA del sedimento celular se realizó utilizando un ensayo comercial de acuerdo con las instrucciones del fabricante (QIAamp® DNA Mini Kit; QIAGEN).

4.15.2. CUANTIFICACIÓN DE DNA VIRAL.

El DNA viral extraído de células infectadas, como se indicó en el apartado anterior, se cuantificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real, empleando el sistema ABI Prism 7900HT SD system (Applied Biosystems) usando un ensayo Custom Taqman específico para una secuencia correspondiente al gen viral US12. Para ello, se empleó la sonda específica Taqman-MGB® (5'-3') AGGCGGCCAGAACC. Se utilizó una escala adecuada de concentración de virus para optimizar la curva estándar. La cuantificación del DNA genómico humano se llevó a cabo usando un ensayo específico del gen *GAPDH* (código: Hs99999905_m1, Applied Biosystems). Los resultados de la cuantificación se realizaron por triplicado y se expresan como número de copias de DNA viral por nanogramo de DNA genómico.

4.16. CUANTIFICACIÓN DE RNA MENSAJERO POR TRANSCRIPCIÓN REVERSA SEGUIDA DE PCR (RT-PCR) CUANTITATIVA.

4.16.1. AISLAMIENTO DE RNA TOTAL.

Las células infectadas se recogieron de la placa y se lavaron con PBS por centrifugación a 800 x g durante 5 minutos. La extracción del RNA del sedimento celular se realizó utilizando un kit comercial de extracción en columnas High Pure RNA Isolation kit (Roche), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante.

Con el fin de valorar la cantidad y calidad del RNA obtenido, se analizaron las muestras en el equipo Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies).

4.16.2. RT-PCR CUANTITATIVA.

La RT-PCR cuantitativa se lleva a cabo en dos etapas. La primera etapa es la transcripción reversa, que consiste en la síntesis de DNA de doble cadena (cDNA) utilizando como molde RNA monocatenario. Para ello se usó el ensayo High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se añaden 0.5 µg de RNA molde a un volumen final de reacción de 50 µl. Los tubos con la mezcla de reacción se sometieron a las siguientes etapas en el termociclador GeneAmp PCR System 2400 o 9600 (Perkin-Elmer): 10 minutos a 25°C y 2 horas a 37°C. El producto obtenido se mantuvo a -20°C hasta su uso.

La segunda etapa es una PCR cuantitativa a tiempo real. Para la cuantificación del mRNA se analizaron 0.5 µl del cDNA obtenido en el ensayo de transcripción reversa. Los ensayos de PCR a tiempo real para el mRNA de *ATG5* y *lamina A/C* fueron diseñados con la herramienta ProbeFinder (Roche) y se emplearon las sondas Universal ProbeLibrary específicas para el mRNA de *ATG5* (#38, cat. N° 04687965001; Roche) y para el mRNA de *lamina A/C* (#14, cat. N° 04685130001; Roche). El cDNA fue amplificado mediante PCR con primers específicos para la secuencia diana: para *ATG5*, CACCTTGTTTCACGCTATATCAGG (directo) y CACTTTGTCAGTTACCAACGTCA (reverso) y para la *lamina A/C*, TCCCTAAACAGCAAGCCATC (directo) y CACAGAATTGTGAAGACAATTACTC (reverso). Para realizar la PCR a tiempo real se utilizó un sistema ABI Prism 7900HT SD® (Applied Biosystems). Se siguieron las condiciones de amplificación suministradas por el proveedor. Las cantidades relativas de *ATG5* y *lamina A/C* se determinaron usando el software SDS v.2.1.1. Para la normalización por cantidad de RNA se usó como gen endógeno *18S*, ya que la expresión de este gen se mantiene constante en todo momento. Se usó un ensayo prediseñado

específico para el gen *18S* humano (código: hs999999_s1, Applied Biosystems). Las reacciones fueron desarrolladas en condiciones universales usando la mezcla de reacción *Taqman* PCR (Applied Biosystem). Para excluir potenciales contaminaciones de los reactivos de la RT-PCR o de la presencia de DNA genómico, se usaron como controles negativos reacciones sin muestra o con RNA (en vez de cDNA), respectivamente.

4.17. ENSAYO DE SILENCIAMIENTO GÉNICO.

Para comprobar la eficiencia del shATG5 diseñado, se sembraron células SK-N-MC y HEK 293 A en placas M-6 y en placas M-24 sobre cubreobjetos. Al día siguiente, fueron cotransfectadas con un vector de expresión de shATG5 (pENTRy-shATG5) y un vector de expresión de ATG5 humano fusionado con GFP (Mizushima y cols., 2001) (cedido amablemente por el Dr. Mizushima), usando el reactivo de transfección lipofectamina. Posteriormente, se comprobó la eficiencia del silenciamiento del gen *ATG5* mediante microscopia de fluorescencia y WB utilizando el anticuerpo anti-GFP.

Una vez generado, amplificado y titulado el adenovirus que expresa shATG5, se transdujeron las células SK-N-MC y SK-APP para realizar ensayos de inhibición de la expresión del gen *ATG5*. Para ello, las células se sembraron en placas M-6 y al día siguiente, se transdujeron con el Ad-shATG5 a distintas moi. Transcurridas 72 horas, se extrajo el RNA y se cuantificó el mRNA de *ATG5* mediante transcripción reversa seguida de PCR cuantitativa, como se ha descrito en el apartado 4.16.2. La cantidad de mRNA de *ATG5* se normalizó con los niveles de mRNA de *GAPDH* humano medidos por RT-PCR.

En paralelo, se comprobó la eficiencia del adenovirus control Ad-shLAM generado. Para ello, se transdujeron las células SK-N-MC y SK-APP sembradas en M-6 a distintas moi durante 72 horas. Transcurrido este tiempo, se analizaron los lisados celulares mediante WB utilizando un anticuerpo que reconoce la proteína lamina A/C.

4.18. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa Microsoft Excel. Todos los datos se expresan como la media \pm el error estándar de la media o la desviación estándar de la media. Se utilizó el test de Student de dos colas para evaluar diferencias entre dos grupos en las que se ha analizado si tienen varianzas iguales o distintas mediante la prueba F. Se establece que las diferencias son significativas para valores con una $p < 0.05$.

RESULTADOS

5. RESULTADOS.

5.1. HSV-1 INDUCE UNA RESPUESTA AUTOFÁGICA INCOMPLETA EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANO.

5.1.1. GENERACIÓN DE HERRAMIENTAS PARA EL ESTUDIO DEL PROCESO AUTOFÁGICO.

5.1.1.1. Generación y caracterización de líneas establemente transfectadas que expresan la proteína de fusión GFP-LC3.

La disposición de un vector de expresión del marcador de autofagosomas, LC3, en forma de proteína de fusión con GFP (GFP-LC3), constituye una excelente herramienta para la monitorización del proceso de autofagia. La iniciación de un proceso autofágico induce la unión de LC3-I a fosfatidiletanolamina dando lugar a la forma LC3-II, que presenta una movilidad electroforética distinta, y la movilización de LC3-II desde el citoplasma a la membrana de las vesículas autofágicas. Estos dos efectos permiten la monitorización de la autofagia mediante WB e inmunocitoquímica. Por ello, se generaron líneas celulares de origen neuronal que sobreexpresan de manera estable la proteína LC3 en forma de proteína de fusión GFP-LC3.

Las células de neuroblastoma humano SK-N-MC fueron transfectadas establemente con la construcción GFP-LC3 mediante el método de precipitación con fosfato cálcico. Se seleccionaron varias colonias por su resistencia al antibiótico geneticina y, finalmente, una de ellas fue expandida y establecida como línea celular a la que se le denominó SK-LC3. En primer lugar, con el objetivo de caracterizar dicha línea, se analizó el efecto de la privación de nutrientes, un inductor clásico de la autofagia mediante microscopía de fluorescencia y WB. Como se muestra en la figura 1A, la fluorescencia presenta un patrón difuso en el cultivo control, que corresponde a la localización de la proteína GFP-LC3-I en el citoplasma. En respuesta a la privación de nutrientes, la conversión de GFP-LC3-I en GFP-LC3-II se pone de manifiesto por la aparición de un patrón de marcaje punteado correspondiente a la acumulación de vesículas autofágicas.

Asimismo, la presencia de vesículas autofágicas en respuesta a la privación nutricional fue claramente detectada por WB al revelarse un aumento en los niveles de la forma GFP-LC3-II (Figura 1A). La relación de los niveles de GFP-LC3-II respecto a los niveles totales de GFP-LC3 (GFP-LC3-I + GFP-LC3-II) es un parámetro cuantitativo muy utilizado para la cuantificación de la autofagia. El análisis densitométrico de las bandas de GFP-LC3 muestra

que la privación de nutrientes incrementa notablemente esta relación. De esta forma, los resultados de WB y microscopía de fluorescencia demuestran que la línea SK-LC3 responde a la activación del proceso autofágico.

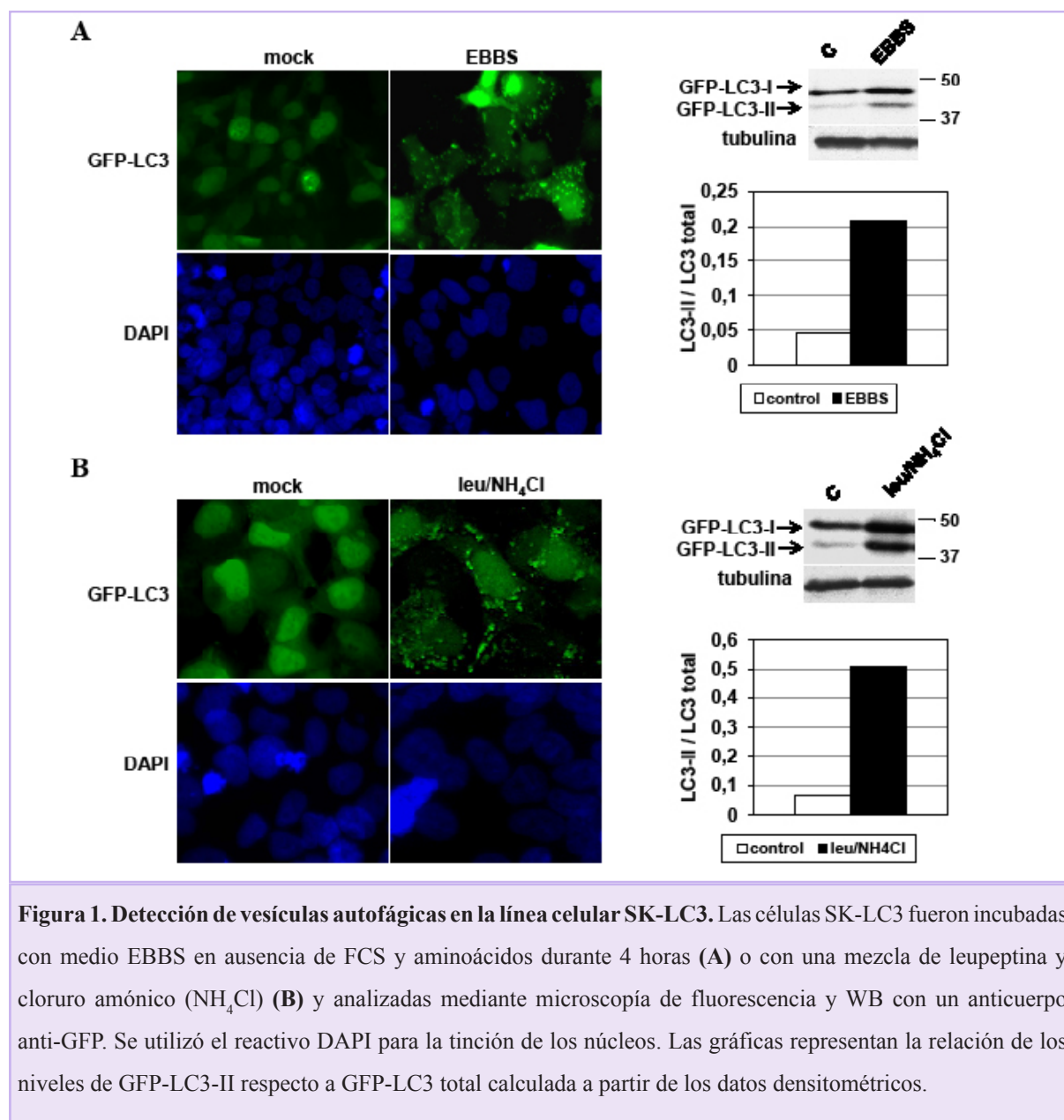


Figura 1. Detección de vesículas autofágicas en la línea celular SK-LC3. Las células SK-LC3 fueron incubadas con medio EBBS en ausencia de FCS y aminoácidos durante 4 horas (A) o con una mezcla de leupeptina y cloruro amónico (NH₄Cl) (B) y analizadas mediante microscopía de fluorescencia y WB con un anticuerpo anti-GFP. Se utilizó el reactivo DAPI para la tinción de los núcleos. Las gráficas representan la relación de los niveles de GFP-LC3-II respecto a GFP-LC3 total calculada a partir de los datos densitométricos.

Para continuar la caracterización de la línea SK-LC3 generada, se analizó el efecto de los inhibidores lisosomales. La ejecución del proceso autofágico conlleva la fusión de los autofagosomas con los lisosomas y, por tanto, la degradación de las proteínas y contenidos citoplasmáticos. Así, la inhibición de la función lisosomal induce la acumulación de vesículas autofágicas. Las células SK-LC3 fueron cultivadas en presencia de una mezcla de

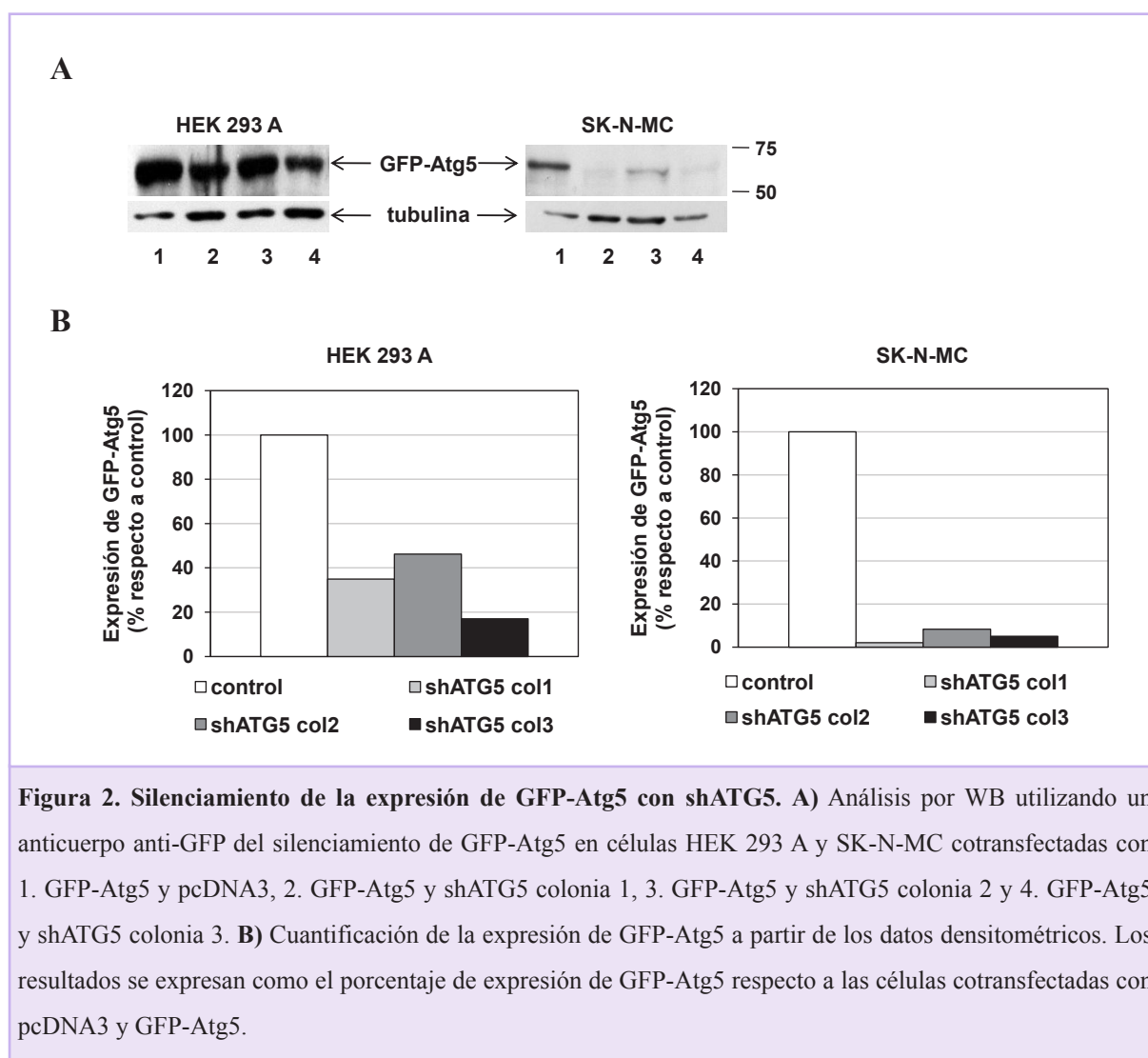
leupeptina, inhibidor de las serina y tiol proteasas lisosomales, y cloruro amónico, un agente lisosomotrópico que neutraliza el pH lisosomal. Mediante microscopía de fluorescencia, se observa que el tratamiento con inhibidores lisosomales provoca una acusada acumulación de vesículas autofágicas como revela el patrón punteado de la fluorescencia. Además, se cuantificó la acumulación de vesículas autofágicas mediante el análisis por WB de los lisados de las células SK-LC3 tratadas con inhibidores lisosomales y se comprobó que el tratamiento provoca un aumento de los niveles de GFP-LC3-II respecto a las células sin tratar (Figura 1B).

Todos estos resultados indican que la línea celular SK-LC3 generada constituye una excelente herramienta para el estudio del proceso autofágico.

5.1.1.2. Generación de un adenovirus que expresa un RNA interferente específico de *ATG5* humano (Ad-shATG5).

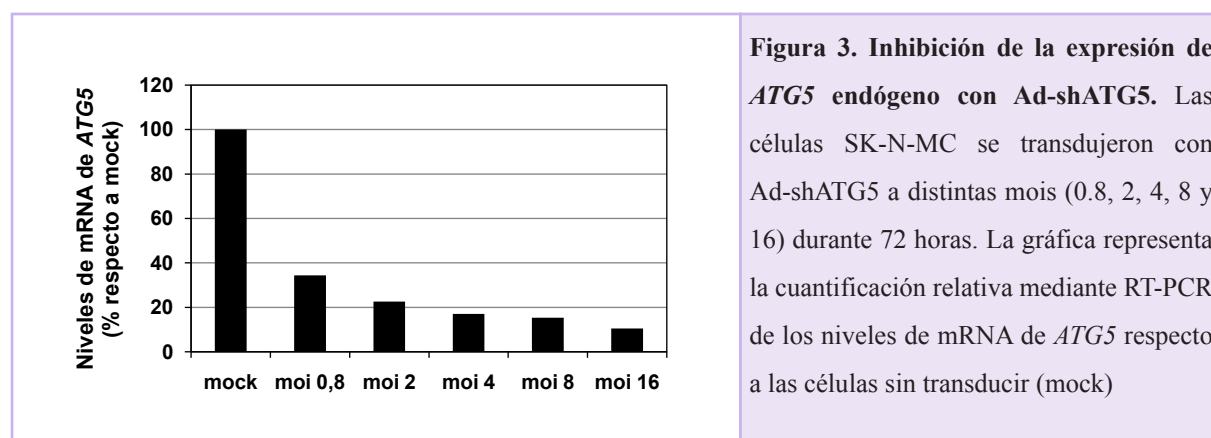
En el proceso autofágico, Atg5 es una proteína clave e imprescindible para la correcta formación de las vesículas autofágicas (Mizushima y cols., 2001). Con el fin de disponer de una herramienta específica para la inhibición de la autofagia, se generó un vector adenoviral que expresa un RNA interferente específico de *ATG5* (Ad-shATG5).

Antes de comenzar la generación del Ad-shATG5, se realizaron transfecciones transitorias con las construcciones que expresaban shATG5 para hacer un screening inicial de la eficiencia del silenciamiento del gen *ATG5*. En la figura 2, se muestra un experimento donde las distintas construcciones que contienen el shATG5 fueron cotransfectadas con un plásmido de expresión de GFP-Atg5 en células HEK 293 A y SK-N-MC. La proteína GFP-Atg5 fue detectada con un anticuerpo anti-GFP. El análisis por WB demuestra que los 3 clones aislados producen una disminución de la banda GFP-Atg5 en células SK-N-MC y HEK 293 A, indicando la eficiencia del RNA de interferencia (Figura 2A). La representación, a partir de los datos densitométricos, del porcentaje de expresión de GFP-Atg5 en las células HEK 293 A y SK-N-MC, reveló que los 3 clones seleccionados producen un silenciamiento de la expresión de GFP-Atg5, obteniéndose más de un 80% de inhibición con la colonia 3 que fue seleccionada para la generación del adenovirus Ad-shATG5 tal y como se describe en el apartado 4.5.2 de Materiales y Métodos (Figura 2B). Finalmente, se determinó el título del Ad-shATG5 en células HEK 293 A que fue de $2,8 \times 10^6$ pfu/ μ l.



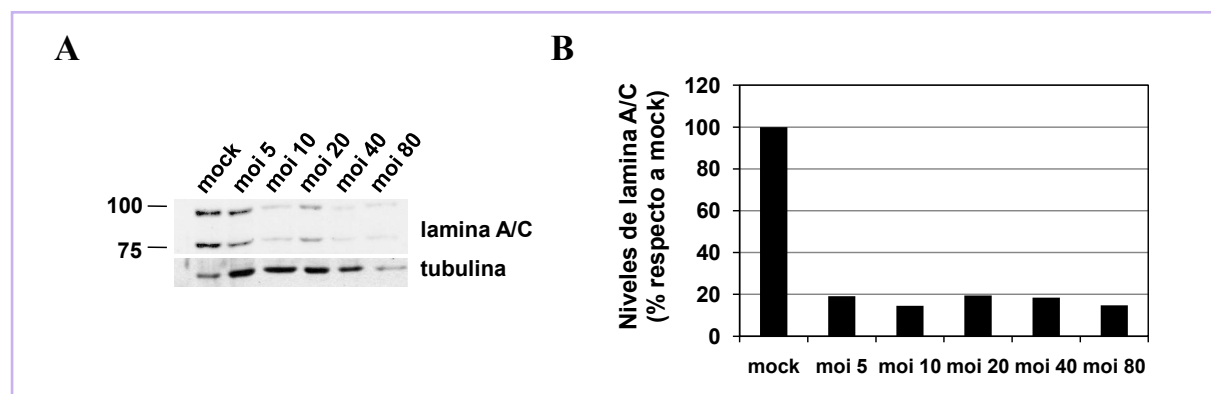
Para comprobar la eficiencia de inhibición del Ad-shATG5, se realizó un experimento donde se transdujeron células SK-N-MC con el Ad-shATG5 a distintas moi (moi 0.8, 2, 4, 8 y 16) durante 72 horas. Pasado este tiempo, se aisló el RNA celular y se realizó una RT-PCR cuantitativa para determinar los niveles de mRNA de *ATG5*. Los valores normalizados mostraron que había una disminución significativa de los niveles de mRNA de *ATG5* en células transducidas con Ad-shATG5 respecto a los niveles encontrados en células sin transducir. En la figura 3, se representan los porcentajes de expresión de mRNA de *ATG5* respecto a las células sin transducir (mock) a las distintas moi utilizadas de Ad-shATG5. La gráfica revela como a 72 horas una moi 0,8 de Ad-shATG5 produce una disminución del 65% de la expresión del mRNA de *ATG5*. La inhibición de la expresión es mayor a medida que aumentamos la multiplicidad de infección alcanzando a una moi 16 una reducción de aproximadamente el 90% de la expresión

del mRNA endógeno de *ATG5*. Estos resultados indican que el Ad-shATG5 constituye una herramienta de gran utilidad para el estudio de la autofagia.



En paralelo, se generó un adenovirus que expresaba un RNA de interferencia específico del gen humano de la *lamina A/C* para utilizarlo como control en los experimentos (Ad-shLAM). La lamina A/C es un componente estructural de la envoltura nuclear y no es esencial para la viabilidad celular (Harborth y cols., 2001). Se determinó el título del Ad-shLAM en células HEK 293 A que fue de 5×10^6 ufp/ μ l.

Para comprobar la eficiencia del Ad-shLAM generado, las células SK-N-MC se transdujeron con el Ad-shLAM a distintas moi (moi 5, 10, 20, 40 y 80) durante 72 horas. Posteriormente, se analizaron mediante WB los niveles de lamina A/C en los lisados celulares utilizando un anticuerpo específico. En todos los casos se obtuvo una disminución cercana al 90% en la expresión de la lamina A/C, demostrando así la eficiencia del adenovirus control generado (Figura 4).



5.1.2. INDUCCIÓN DE UN PROCESO AUTOFÁGICO EN CÉLULAS SK-LC3.

Se inició la caracterización de la autofagia en células SK-LC3 infectadas con HSV-1 analizando el marcador de autofagia LC3. El análisis por WB de la proteína LC3 es el método más utilizado en la literatura para monitorizar la autofagia (Mizushima, 2004).

En primer lugar, se estudió si la infección con HSV-1 inducía la lipidación de GFP-LC3 en las células SK-LC3. Para ello, se analizaron por WB los lisados de células SK-LC3 infectadas durante 8 y 18 horas con HSV-1. Los resultados revelan que, mientras en células sin infectar no se detecta la aparición de GFP-LC3-II a ninguno de los tiempos analizados, la infección con HSV-1 induce el aumento de los niveles de GFP-LC3-II de una forma dependiente de tiempo y de dosis viral (Figura 5A). La densitometría de las bandas de GFP-LC3 permite concluir que HSV-1 induce una acumulación de GFP-LC3-II que se inicia antes de las 8 h.p.i.

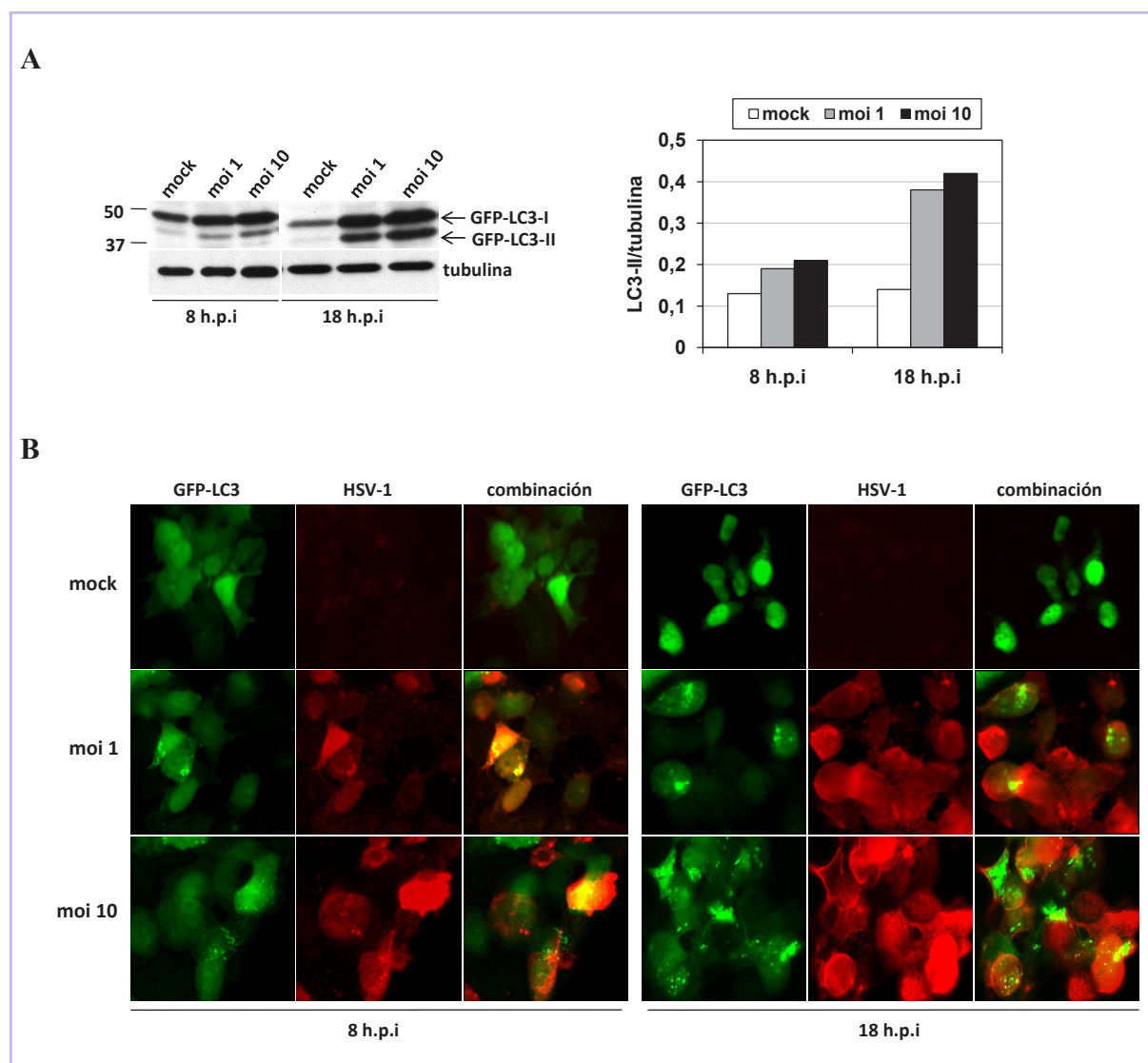


Figura 5. HSV-1 induce la acumulación de vesículas autofágicas en las células SK-LC3. **A)** Análisis mediante WB con el anticuerpo anti-GFP de células SK-LC3 infectadas a una moi de 1 y 10 ufp por célula durante 8 y 18 horas. Se muestra el WB de tubulina como control de carga de proteína. También se muestra la representación de los niveles de GFP-LC3-II respecto a los niveles de GFP-LC3 totales a partir de los datos densitométricos. Se muestra un experimento representativo de cinco realizados. **B)** Imágenes de microscopía de fluorescencia de células SK-LC3 control e infectadas con HSV-1 (moi 1 y 10 ufp por célula) durante 8 y 18 horas. Las células infectadas se identificaron con un anticuerpo anti-HSV-1 que reconoce varias glicoproteínas virales. Magnificación original 63x.

Para comprobar que el aumento de GFP-LC3-II cursaba con una acumulación de vesículas autofágicas, las células SK-LC3 infectadas con HSV-1 fueron analizadas por microscopía de fluorescencia. El análisis de la distribución de GFP-LC3 reveló que HSV-1 produce un patrón de marcaje vesicular de GFP-LC3, característico de compartimentos autofágicos, claramente diferenciable del patrón citosólico de las células sin infectar. Además, todas las células que contenían estructuras GFP-LC3 positivas estaban infectadas con HSV-1, como reveló la inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-HSV-1, que reconoce diferentes glicoproteínas virales (Figura 5B).

Continuando con la caracterización del proceso autofágico inducido por HSV-1, se llevó a cabo un estudio temporal de la aparición de GFP-LC3-II mediante WB. El análisis densitométrico de los datos reveló que GFP-LC3-II se acumula de una forma dependiente de tiempo en las células SK-LC3, indicando que el virus induce la movilización progresiva de GFP-LC3-II a las vesículas autofágicas a partir de 6 h.p.i (Figura 6).

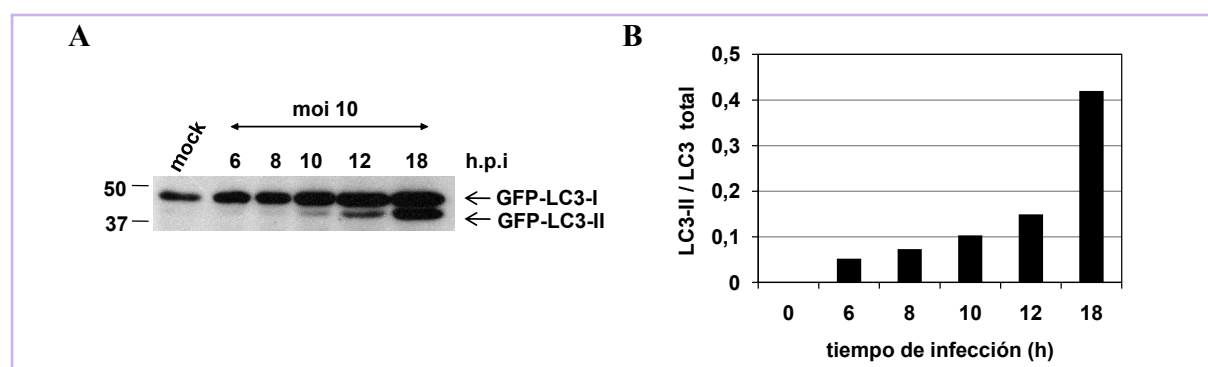
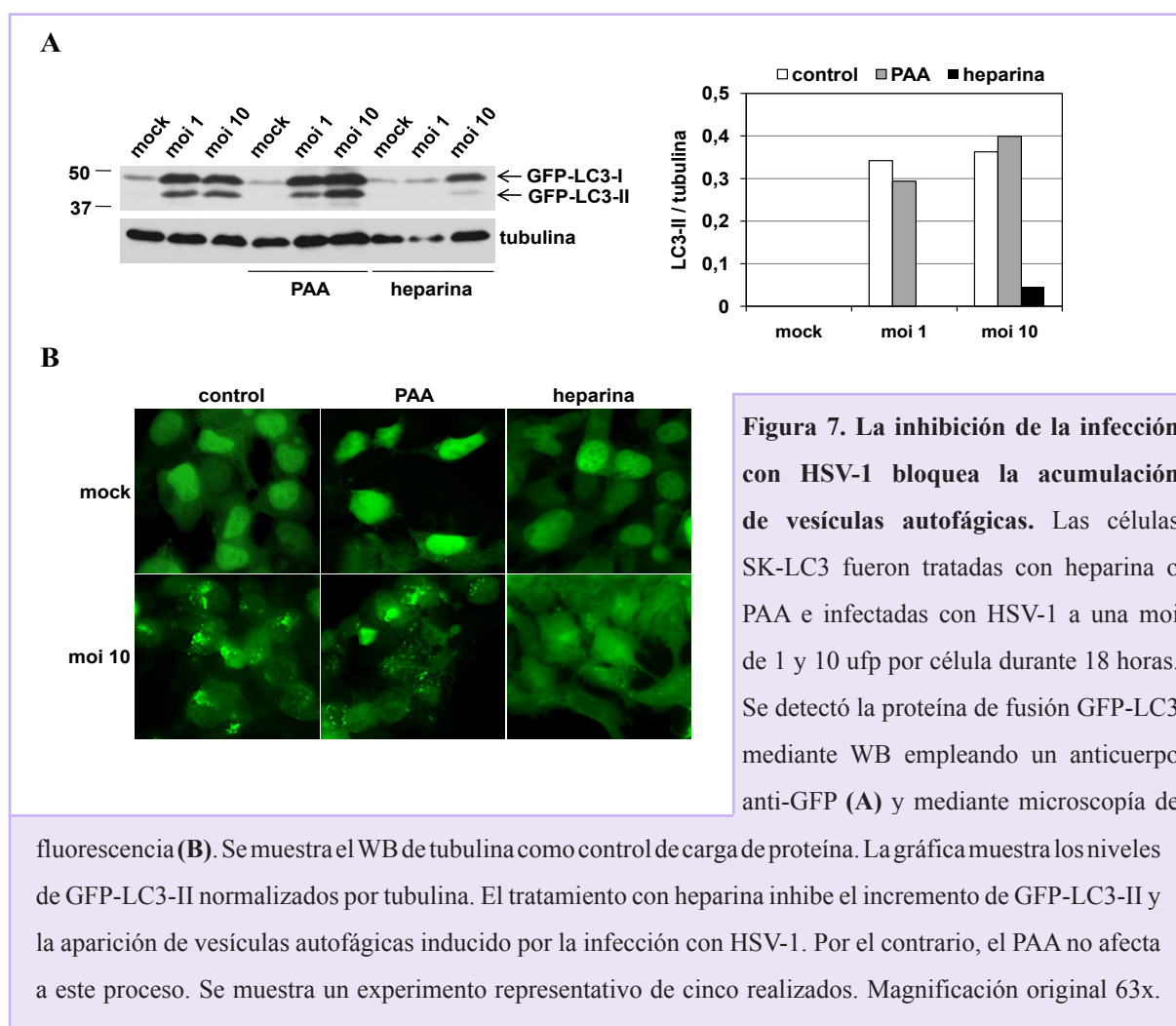


Figura 6. HSV-1 induce la acumulación de LC3-II de una forma dependiente del tiempo de infección. **A)** Las células SK-LC3 se infectaron con HSV-1 a una moi de 10 ufp por célula a distintos tiempos (6, 8, 10, 12 y 18 horas) y se detectó la formación de GFP-LC3-II mediante WB utilizando un anticuerpo anti-GFP. **B)** Representación de la relación de los niveles de GFP-LC3-II respecto a GFP-LC3 total en los distintos tiempos de infección a partir de los datos densitométricos.

Con el fin de corroborar que la infección con HSV-1 provocaba específicamente la acumulación de vesículas autofágicas, se realizaron experimentos con dos inhibidores virales: PAA, un inhibidor de la DNA polimerasa viral, y heparina, un inhibidor de la entrada del virus en la célula. En la figura 7A, se muestra que el tratamiento de las células SK-LC3 con la heparina revierte completamente el incremento de la inmunorreactividad de GFP-LC3-II inducido por la infección con HSV-1, mientras que el tratamiento con PAA no afecta a este proceso. Además, ensayos de microscopía de fluorescencia, confirmaron los resultados del WB ya que la heparina, pero no el PAA, previene la formación de las estructuras vesiculares GFP-LC3 positivas inducidas por HSV-1 (Figura 7B). En conjunto, estos resultados indican que la acumulación de GFP-LC3 observada en las células SK-LC3 está causada específicamente por la infección con HSV-1 pero que no es necesaria una infección productiva para inducir la acumulación.



La cicloheximida es una droga ampliamente utilizada en virología para determinar si un proceso es dependiente de la síntesis de proteínas virales. El tratamiento con cicloheximida de las células SK-N-MC infectadas con HSV-1 inhibió completamente la acumulación de vesículas autofágicas como se observó en los experimentos de inmunofluorescencia (Figura 8A). La cicloheximida también previno la acumulación de la glicoproteína viral gC comprobando, de esta forma, la efectividad de la droga. El análisis mediante WB confirmó este resultado, ya que el tratamiento con este inhibidor de la síntesis de proteínas, disminuyó la inmunorreactividad de GFP-LC3-II a los mismos niveles de las células sin infectar (Figura 8B).

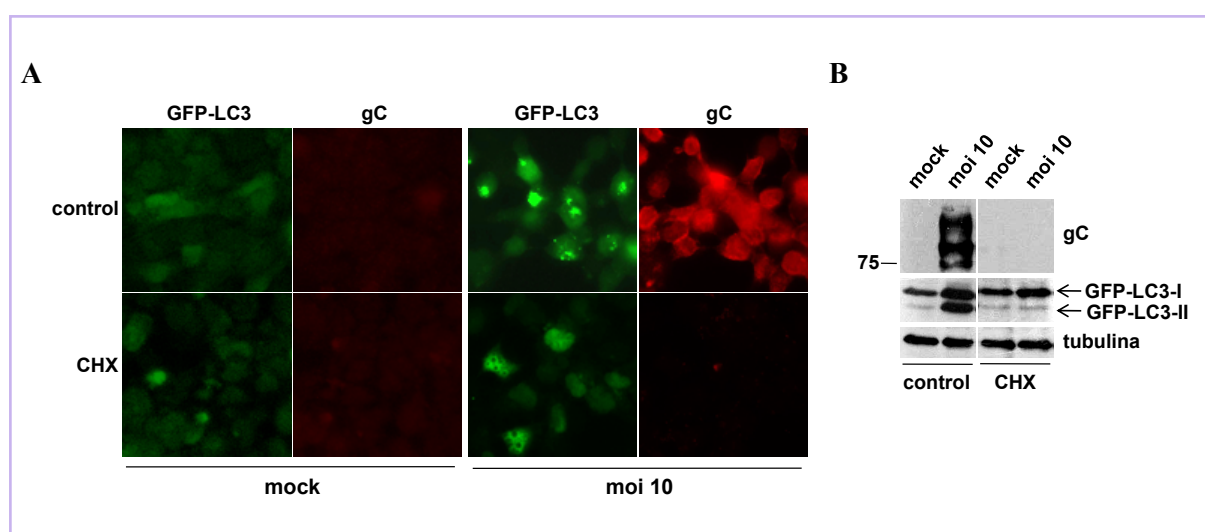
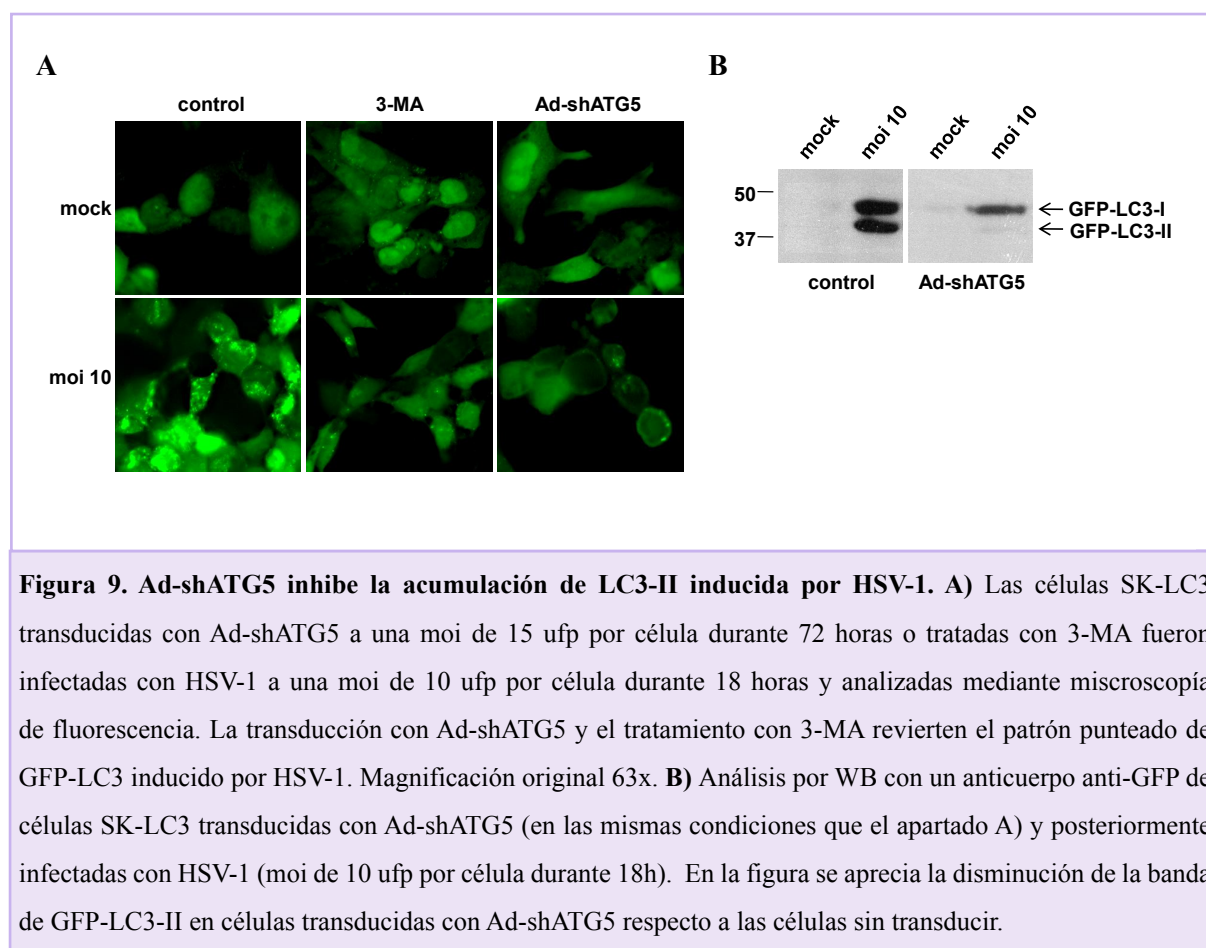


Figura 8. Efecto de la cicloheximida sobre la acumulación de GFP-LC3-II en células SK-LC3 infectadas con HSV-1. Las células SK-LC3 infectadas con HSV-1 a una moi de 10 ufp por célula durante 18 horas y tratadas con cicloheximida (CHX) fueron analizadas mediante inmunofluorescencia (A) y WB (B). La infección se monitorizó utilizando un anticuerpo específico de la glicoproteína gC de HSV-1. Se muestra el WB de tubulina como control de carga de proteína. Magnificación original 63x.

Estos resultados demuestran que la acumulación de vesículas autofágicas es dependiente de la síntesis de proteínas virales pero no de la replicación de HSV-1, indicando que la expresión de los genes tardíos, que es dependiente de la síntesis de DNA viral, no es requerida para producir este efecto.

Con el objetivo de asegurar que HSV-1 estaba induciendo un proceso autofágico, se comprobó el efecto de inhibidores específicos de autofagia sobre la acumulación de las vesículas autofágicas. Para ello, se utilizó un inhibidor farmacológico de las etapas tempranas de la autofagia, 3-MA y el adenovirus descrito en el apartado 5.1.1.2 de Resultados que expresa un shRNA específico contra *ATG5*, Ad-shATG5. Los ensayos de microscopía de fluorescencia

muestran que el tratamiento con 3-MA y el Ad-shATG5 revierten casi completamente la acumulación de vesículas autofágicas inducida por la infección con HSV-1 (Figura 9A). Además, el Ad-shATG5 también previene la modificación postraduccional de GFP-LC3 inducida por HSV-1 en las células SK-LC3 (Figura 9B). Los resultados obtenidos con inhibidores del proceso autofágico confirman que HSV-1 induce la acumulación de vesículas autofágicas auténticas en las células SK-LC3.



5.1.3. INDUCCIÓN DE UN PROCESO AUTOFÁGICO EN CÉLULAS SK-N-MC.

Se ha descrito que la proteína de fusión GFP-LC3 se asocia con agregados de proteínas, especialmente cuando se sobreexpresa en presencia de proteínas con tendencia a la agregación, de una manera independiente de la autofagia (Kuma y cols., 2007). Por lo tanto, para evitar posibles artefactos procedentes de la sobreexpresión de GFP-LC3, se analizó los efectos de la infección con HSV-1 en el procesamiento y en el patrón de distribución de la proteína LC3 endógena.

En concordancia con los resultados obtenidos en las células transfectadas con GFP-LC3, el

análisis por WB mostró un acusado incremento en los niveles de LC3-II en células SK-N-MC infectadas con HSV-1 durante 18 horas, acompañado de una reducción de los niveles de LC3-I (Figura 10A). Como se desprende de la representación de los datos densitométricos, el aumento de los niveles de LC3-II normalizados por tubulina es dependiente de la dosis viral. Los ensayos de inmunofluorescencia confirman los resultados obtenidos en las células SK-LC3. Aunque la proteína LC3 endógena es indetectable en las células sin infectar, se observa un aumento del marcaje de LC3 endógeno en las células SK-N-MC infectadas, indicando que se produce una activación de la respuesta autofágica inducida por la infección con HSV-1 (Figura 10B).

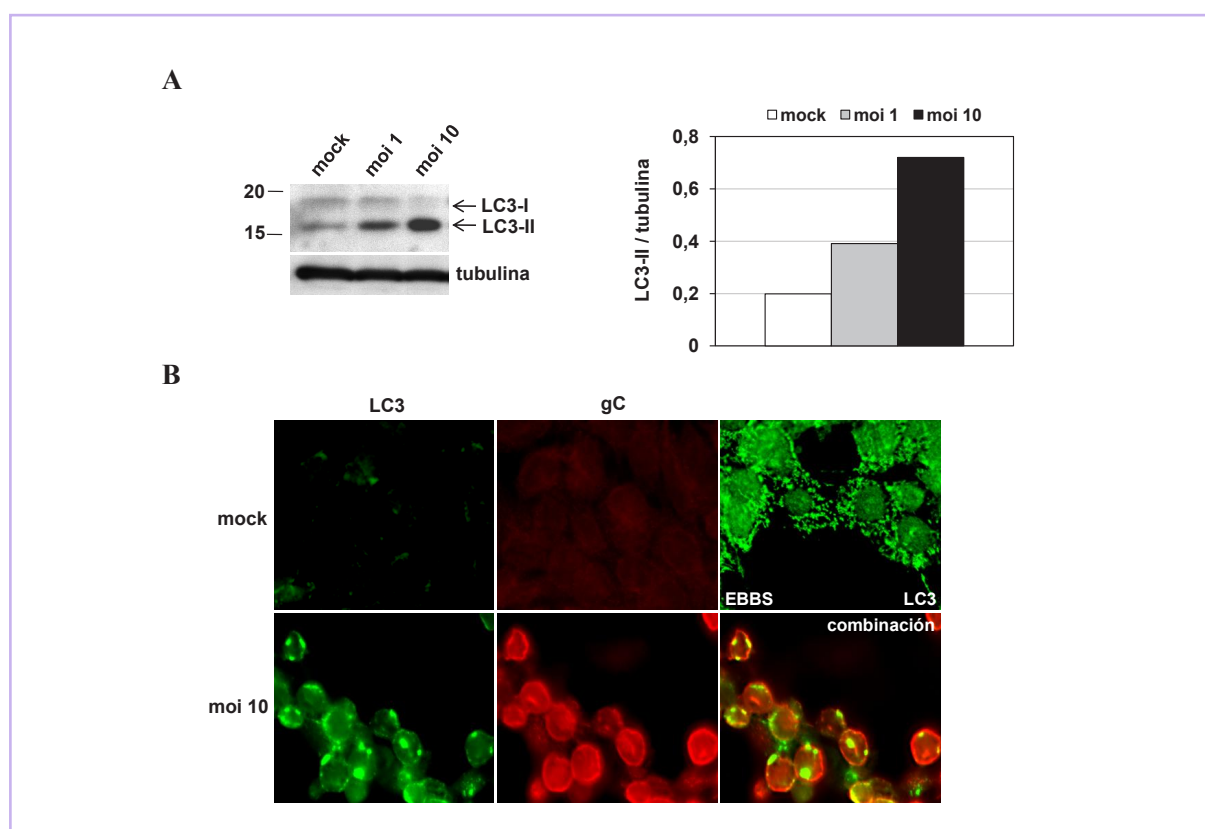


Figura 10. HSV-1 induce la acumulación de la proteína LC3-II endógena en las células SK-N-MC. **A)** Las células SK-N-MC fueron infectadas con HSV-1 a una moi de 1 y 10 ufp por célula durante 18 horas y se analizaron mediante WB los niveles de LC3-II endógeno. Los niveles de tubulina se muestran como control de carga de proteína. La representación, a partir de los datos densitométricos, de los niveles de LC3-II normalizados por tubulina muestran que los niveles de LC3-II endógeno aumentan como consecuencia de la infección con HSV-1. Se muestra un experimento representativo de cinco realizados. **B)** Imágenes de fluorescencia de células SK-N-MC sin infectar e infectadas con HSV-1 a una moi de 10 ufp por célula durante 18 horas. La acumulación de LC3 endógeno tiene lugar en las células infectadas con HSV-1, detectadas con un anticuerpo que reconoce la glicoproteína gC del virus. En el panel, se muestran células SK-N-MC sometidas a privación nutricional (EBBS) como control positivo de la activación de la autofagia. Magnificación original 63x.

De acuerdo con los resultados obtenidos en las células SK-LC3, el tratamiento de las células SK-N-MC con heparina, pero no con PAA, inhibe el incremento de los niveles de LC3-II endógeno inducido por la infección como se observa en los análisis de WB e inmunofluorescencia (Figura 11A y 11B). Estos datos indican que este efecto es provocado específicamente por la infección con HSV-1 pero no es dependiente de la replicación viral. Con el fin de confirmar que el PAA y la heparina estaban inhibiendo eficientemente la infección, se realizó un experimento con células SK-N-MC tratadas con PAA o heparina e infectadas a distintas moi durante 18 horas, en el que se cuantificaron los niveles de DNA viral mediante PCR cuantitativa utilizando un ensayo específico para el gen *US12* de HSV-1. Los resultados revelaron que ambos inhibidores reducen en gran medida la replicación viral, obteniéndose más de un 95% de disminución de los niveles de DNA viral en todas las condiciones (Figura 11C).

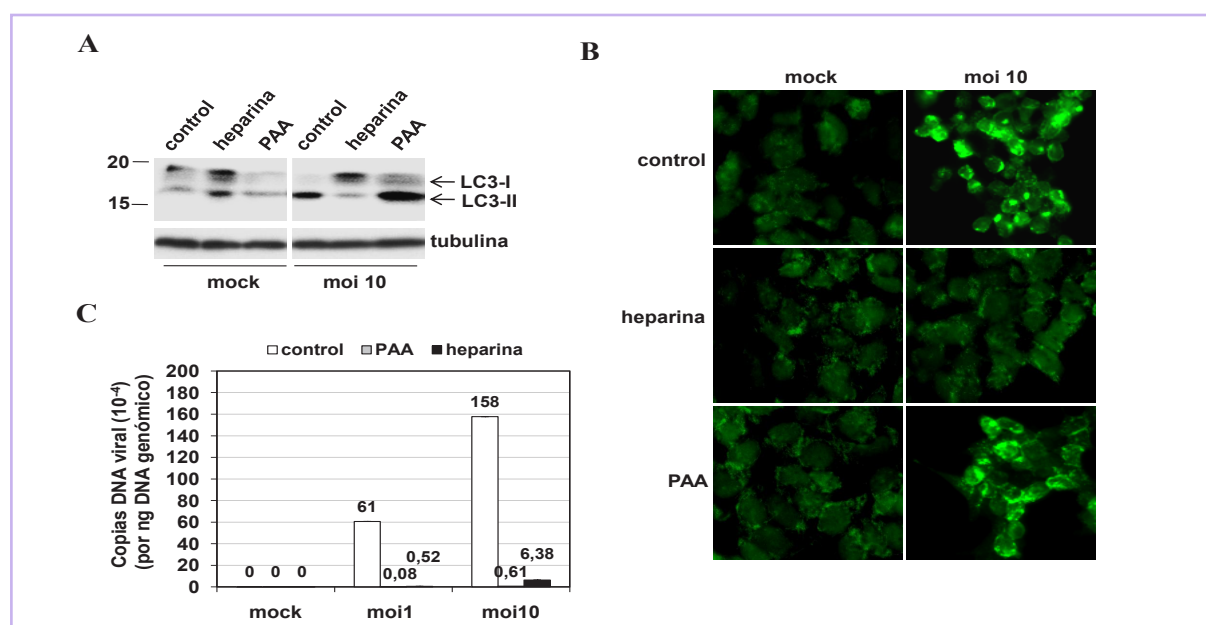
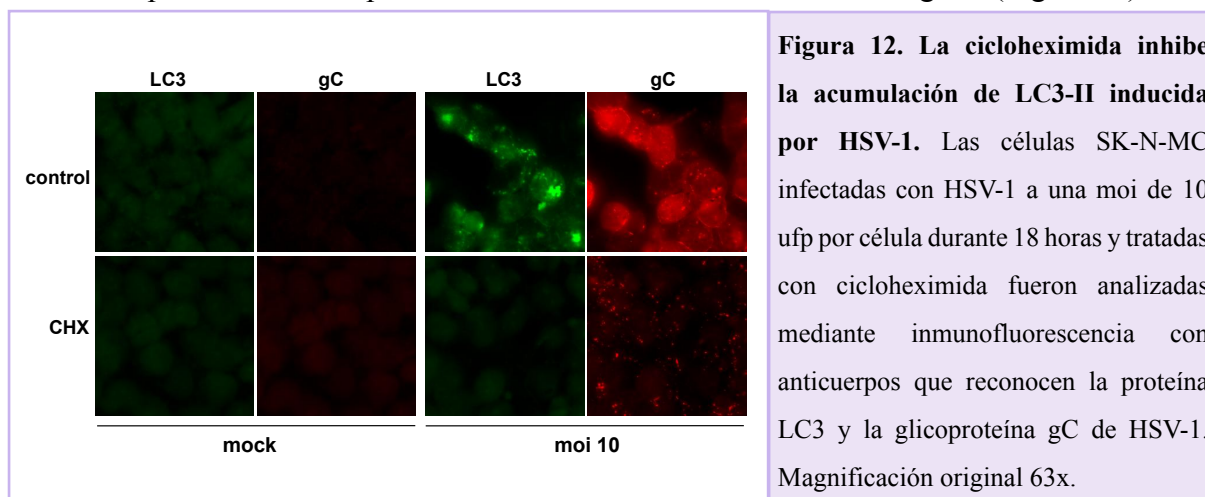
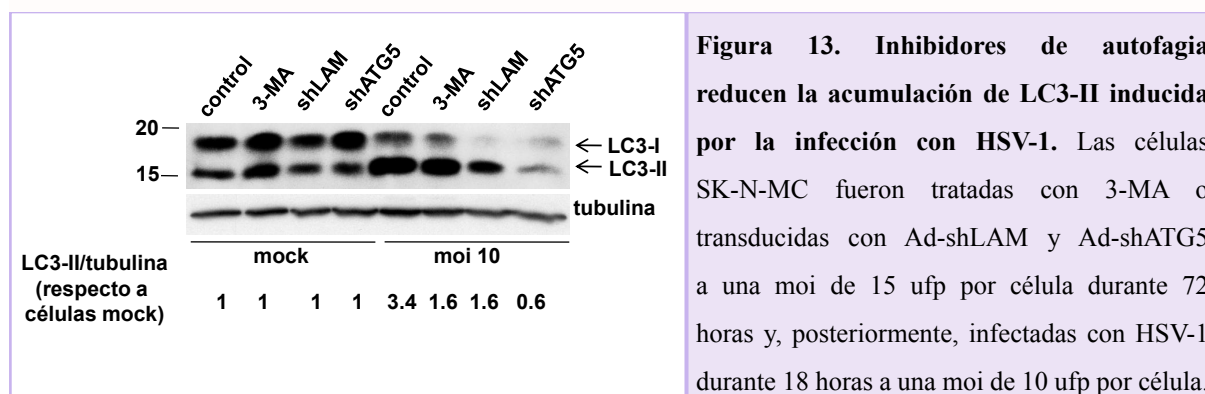


Figura 11. Efecto de los inhibidores virales sobre la acumulación de LC3-II endógeno en las células SK-N-MC. Análisis de la proteína LC3 endógena utilizando un anticuerpo anti-LC3 mediante WB (**A**) e inmunofluorescencia (**B**) en células SK-N-MC infectadas con HSV-1 a una moi de 10 upf por célula durante 18 horas y tratadas con heparina o PAA. El tratamiento con PAA no altera la inmunorreactividad de LC3 en las células infectadas. Por el contrario, el tratamiento con heparina revierte completamente la acumulación de LC3-II inducida por HSV-1. Se muestra un experimento representativo de 5 realizados. Magnificación original 63x. **C**) Determinación de la cantidad de DNA viral mediante PCR cuantitativa en células infectadas con HSV-1 a una moi de 1 y 10 upf por célula durante 18 horas en presencia o ausencia de PAA y heparina. El tratamiento con PAA y heparina disminuye significativamente la cantidad de DNA viral. Los números encima de las columnas representan las copias de DNA viral por nanogram (ng) de DNA genómico. Se representan los valores de las medias de los triplicados de un experimento representativo de tres experimentos independientes. Las barras de error representan la desviación estándar de la media.

Al analizar el efecto de la CHX sobre los niveles de LC3-II endógeno en las células SK-N-MC, se obtuvieron los mismos resultados que en las células SK-LC3. El tratamiento con cicloheximida previno por completo tanto la acumulación de vesículas autofágicas como de la glicoproteína viral gC en las células infectadas con HSV-1, confirmando el requerimiento de la síntesis de proteínas virales para la acumulación de las vesículas autofágicas (Figura 12).



A continuación, se analizó el efecto de los inhibidores del proceso autofágico sobre la acumulación de la proteína LC3-II endógena inducida por la infección con HSV-1. Ad-shATG5, y en menor medida 3-MA, bloquean el aumento de los niveles de LC3-II endógeno causado por la infección con HSV-1 en células SK-N-MC. Sin embargo, los inhibidores autofágicos no afectan significativamente a los niveles de LC3-II en células sin infectar (Figura 13)



Se analizó la inmunorreactividad de la proteína LC3 endógena con un anticuerpo anti-LC3. Se muestra un WB de tubulina representativo como control de carga de proteína. Los valores numéricos bajo los paneles de WB representan los niveles de LC3-II normalizados por tubulina respecto a los cultivos sin infectar.

En resumen, todos estos resultados indican que la infección con HSV-1 induce la acumulación de vesículas autofágicas y que este efecto está mediado específicamente por proteínas implicadas en el proceso autofágico, como Atg5.

5.1.4. HSV-1 INDUCE UNA RESPUESTA AUTOFÁGICA IMCOMPLETA.

5.1.4.1. Efecto de los inhibidores lisosomales sobre GFP-LC3 y LC3 endógeno.

La medida de los niveles de LC3-II a tiempos tardíos de infección demuestra que HSV-1 induce una acumulación de autofagosomas. Sin embargo, es necesario determinar si la acumulación es debida a un incremento de la actividad autofágica o a un bloqueo de la maduración de las vesículas autofágicas o de la fusión de éstas con los lisosomas. Con este fin, se diseñaron una serie de experimentos para monitorizar la progresión y la ejecución de la autofagia, es lo que se denomina flujo autofágico (Klionsky y cols., 2008). En primer lugar, se analizó mediante WB el efecto de los inhibidores lisosomales leupeptina y cloruro amónico sobre los niveles de LC3-II. Los inhibidores lisosomales impiden la degradación del contenido de los autofagosomas, causando un aumento de los niveles de LC3-II en condiciones de autofagia funcional.

En las células SK-LC3, los inhibidores lisosomales causaron un marcado aumento de los niveles de GFP-LC3-II. El tratamiento con rapamicina, la droga inductora de autofagia más universalmente utilizada, no afectaba a los niveles de GFP-LC3-II, pero en presencia de inhibidores lisosomales los niveles de GFP-LC3-II fueron aún mayores que en las células control, indicando que GFP-LC3-II es rápidamente eliminado por la vía autofágica en células sin infectar (Figura 14A). En etapas tempranas de la infección (8 h.p.i), se observaba un aumento de los niveles de GFP-LC3-II en células SK-LC3 infectadas en presencia de inhibidores lisosomales. Este aumento era similar al que tenía lugar en células sin infectar (aproximadamente 5 veces; Figura 14B). Por el contrario, en etapas tardías de la infección (18 h.p.i), los inhibidores lisosomales causaban un modesto aumento de los niveles de GFP-LC3-II (menos de dos veces) en comparación con las células sin infectar (más de diez veces; Figura 14C). Estos datos sugieren que HSV-1 induce una fuerte disminución del flujo autofágico en etapas tardías de la infección.

Al analizar el efecto de los inhibidores lisosomales sobre los niveles de LC3-II endógeno en células SK-N-MC los resultados fueron muy similares. El tratamiento con inhibidores lisosomales tanto de células SK-N-MC sin infectar como infectadas con HSV-1 durante 8 horas causaba un gran incremento de los niveles de LC3-II (Figura 15A). De igual modo que en las células SK-LC3, los inhibidores lisosomales inducían un pequeño incremento de los niveles de LC3-II endógeno en las células SK-N-MC infectadas con HSV-1 durante 18 horas (menos de 2 veces) mientras que inducían un gran aumento de la cantidad de LC3-II endógeno en las células sin infectar (más de 5 veces a 18 horas) (Figura 15B). Por lo tanto, los resultados obtenidos en las células SK-LC3 y SK-N-MC sugieren que la acumulación de LC3-II en las células infectadas con HSV-1 puede deberse, en su mayor parte, a la inhibición de la fusión de los lisosomas con

con los autofagosomas o a una deficiencia en la capacidad degradativa de los lisosomas más que a una activación del proceso autofágico. En resumen, los resultados revelan que sólo algunas de las moléculas de LC3-II inducidas por HSV-1 son degradadas por los lisosomas produciéndose como consecuencia una acumulación de autofagosomas en las células infectadas con HSV-1.

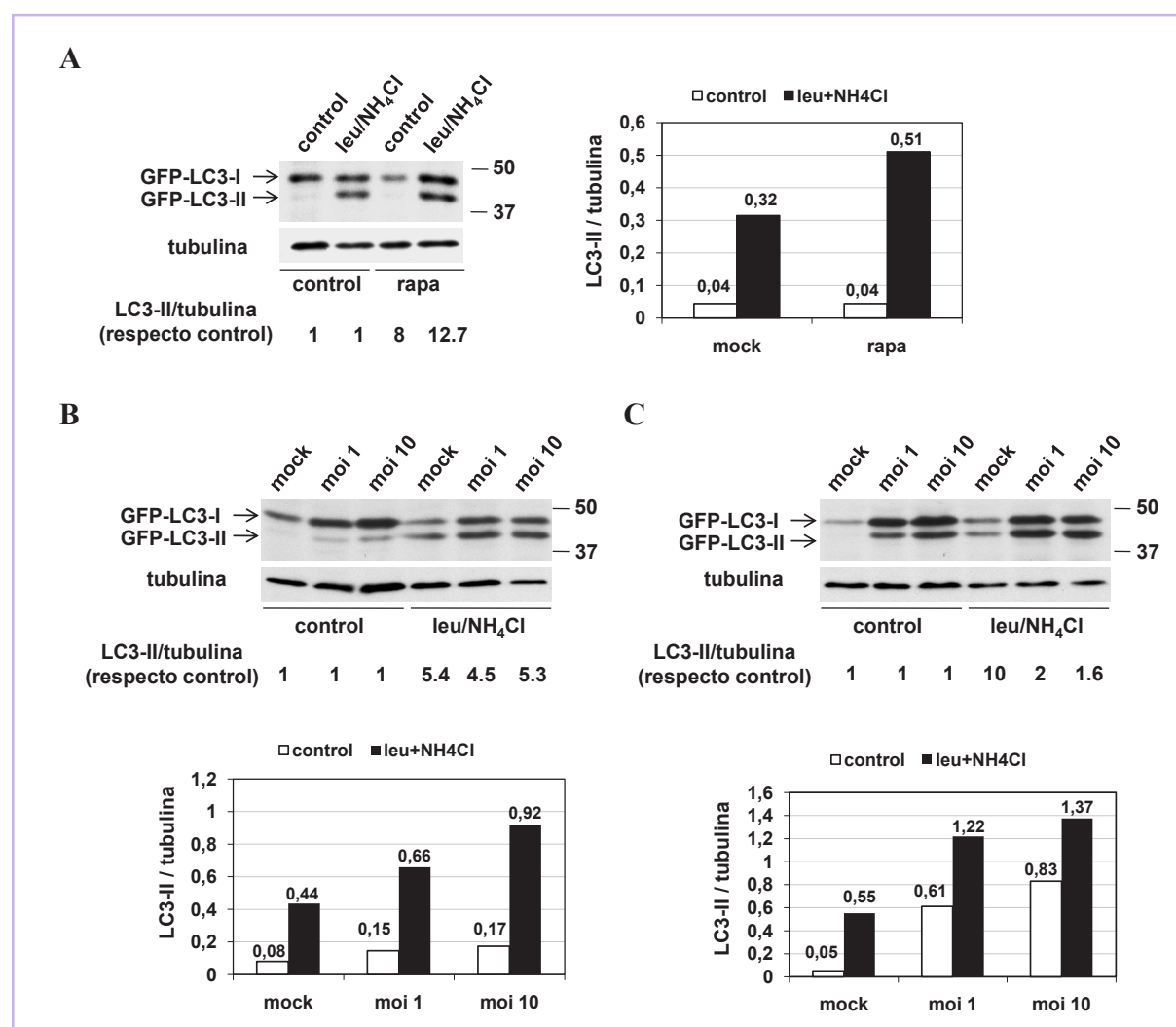


Figura 14. Efecto de los inhibidores lisosomales sobre los niveles de GFP-LC3 en células SK-LC3 infectadas con HSV-1. Análisis mediante WB de células SK-LC3 tratadas con rapamicina durante 18 horas (A) o infectadas con HSV-1 a una moi de 1 y 10 ufp por célula durante 8 (B) y 18 horas (C) en ausencia o presencia de leupeptina y cloruro amónico. Se utilizó un anticuerpo anti-GFP para detectar los niveles de GFP-LC3. Se muestra un WB de tubulina como control de carga de proteína. En todos los paneles se detalla la representación, a partir de los datos densitométricos, de los niveles de GFP-LC3-II normalizados por tubulina. Los números encima de las columnas representan los valores densitométricos. Los valores numéricos bajo los paneles de WB representan los niveles de LC3-II normalizados por tubulina de cultivos tratados con inhibidores lisosomales respecto a los cultivos sin tratar. En todos los casos, se muestra un experimento representativo de al menos 5 realizados.

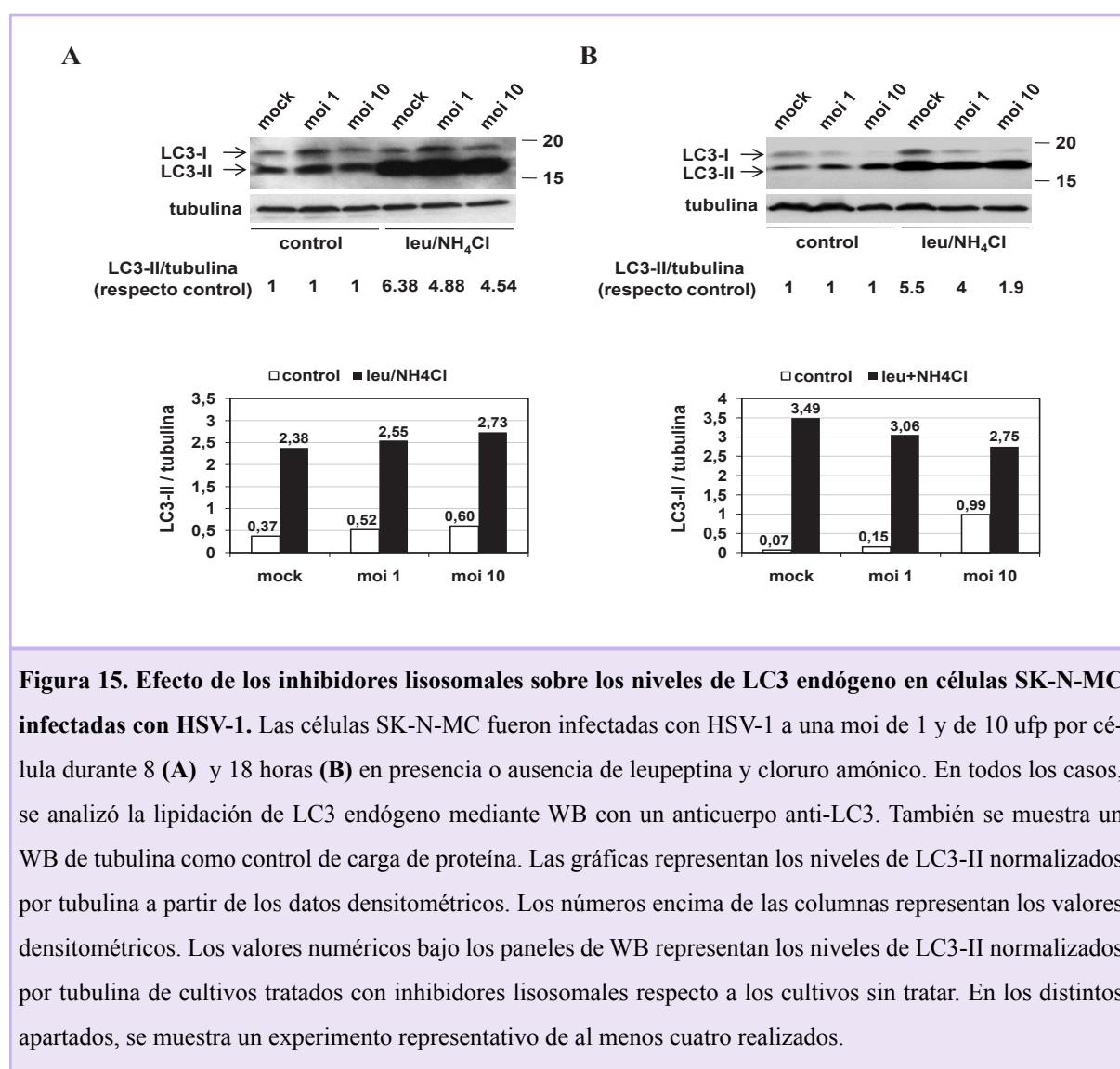


Figura 15. Efecto de los inhibidores lisosomales sobre los niveles de LC3 endógeno en células SK-N-MC infectadas con HSV-1. Las células SK-N-MC fueron infectadas con HSV-1 a una moi de 1 y de 10 ufp por célula durante 8 (A) y 18 horas (B) en presencia o ausencia de leupeptina y cloruro amónico. En todos los casos, se analizó la lipidación de LC3 endógeno mediante WB con un anticuerpo anti-LC3. También se muestra un WB de tubulina como control de carga de proteína. Las gráficas representan los niveles de LC3-II normalizados por tubulina a partir de los datos densitométricos. Los números encima de las columnas representan los valores densitométricos. Los valores numéricos bajo los paneles de WB representan los niveles de LC3-II normalizados por tubulina de cultivos tratados con inhibidores lisosomales respecto a los cultivos sin tratar. En los distintos apartados, se muestra un experimento representativo de al menos cuatro realizados.

5.1.4.2. Análisis por inmunofluorescencia de la proteína p62.

La proteína p62, también denominada secuestrosoma 1 (SQSTM1), es un componente común de los agregados de proteínas ubiquitinadas en muchas enfermedades neurodegenerativas (Bjorkoy y cols., 2009). La proteína p62 se une directamente a LC3, incorporándose a los autofagosomas y degradándose mediante el proceso autofágico, por lo que la medición de los niveles de p62 es un método ampliamente utilizado para monitorizar el flujo autofágico (Klionsky y cols., 2008).

Dado que nuestros resultados indican que la infección con HSV-1 induce la acumulación de autofagosomas, se analizó si también se producía un aumento de p62 en las células SK-N-MC infectadas con HSV-1. Para ello, se realizó un ensayo de microscopía confocal con el fin de

analizar los niveles y el patrón de distribución de la proteína p62 utilizando un anticuerpo específico. En las células sin infectar, los niveles de p62 son indetectables pero como consecuencia de la infección se induce un marcado aumento de p62 (Figura 16).

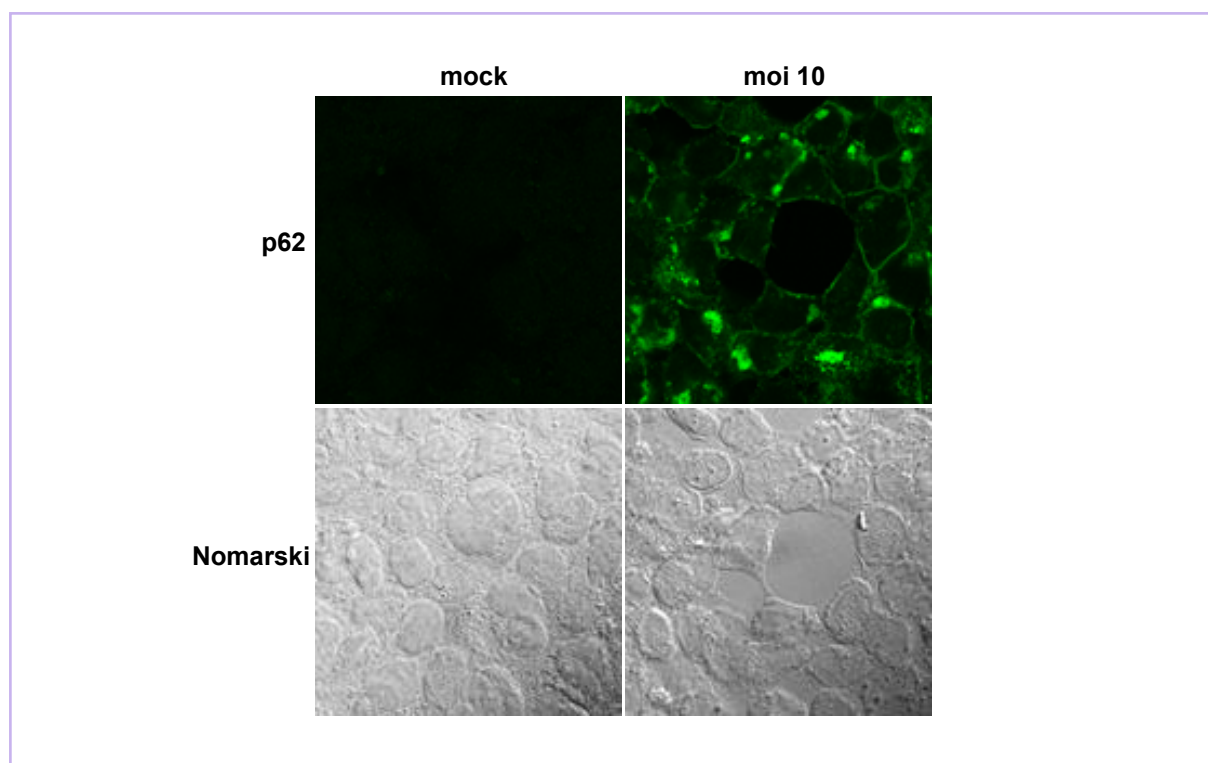
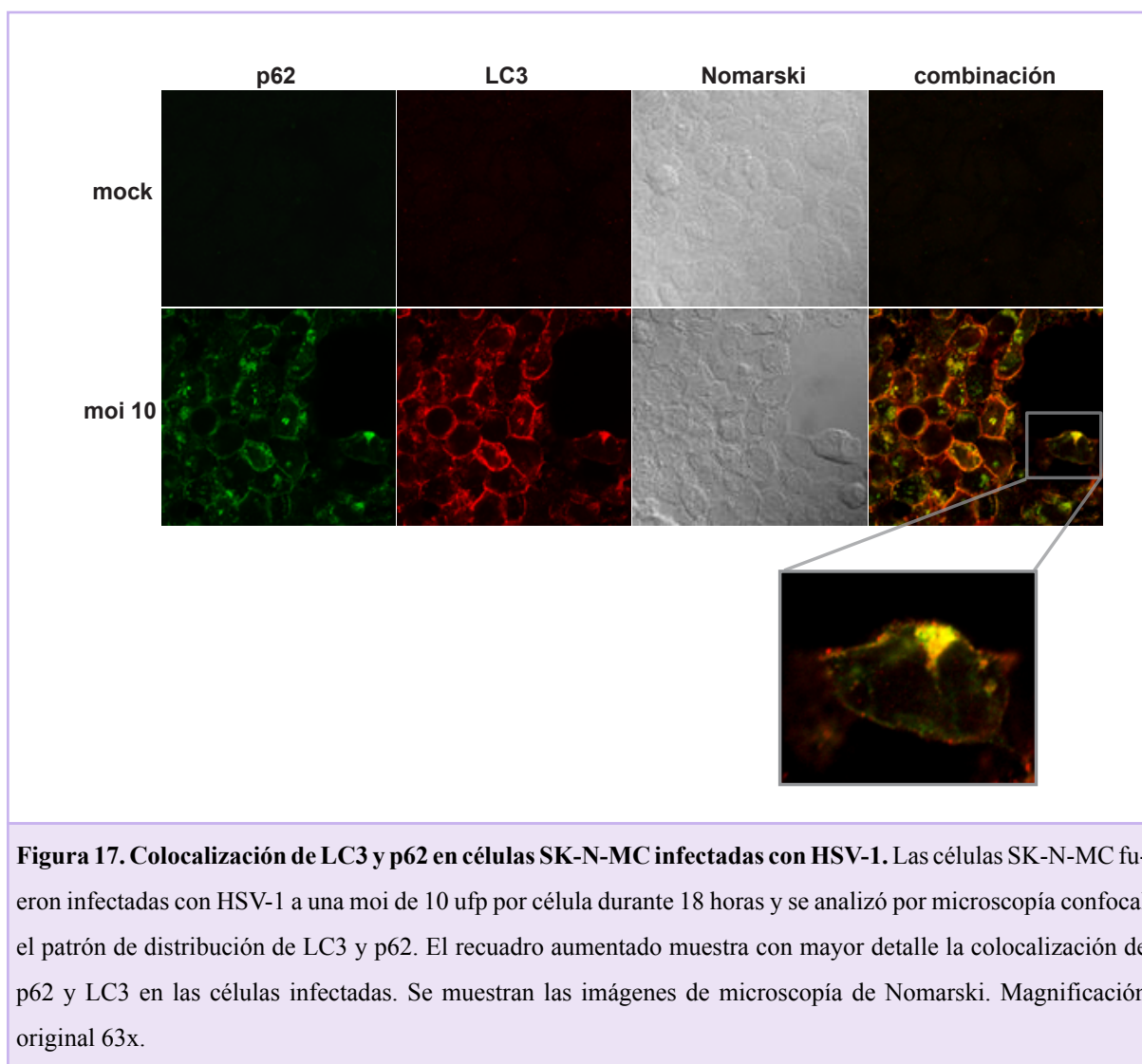


Figura 16: Acumulación de p62 en células SK-N-MC infectadas con HSV-1. Las células SK-N-MC fueron infectadas con HSV-1 a una moi de 10 ufp por células durante 18 horas y se analizó por microscopía confocal la proteína p62 con un anticuerpo específico. La infección con HSV-1 induce una marcada acumulación de p62. Se muestran las imágenes por microscopía de Nomarski. Magnificación original 63x.

La proteína p62 en células infectadas presenta un patrón de distribución que recuerda al patrón de marcaje de las vesículas autofágicas. Por ello, se realizaron ensayos de microscopía confocal con el fin de analizar si existía una colocalización de las proteínas LC3 y p62. La proteína LC3 endógena revela un patrón de distribución concentrado correspondiente a la acumulación de vesículas autofágicas. Por otro lado, la proteína p62 presenta una localización casi idéntica a la de LC3, como indica el marcaje amarillo en la figura combinada (Figura 17). Estos resultados revelan que la proteína p62 que se acumula tras la infección con HSV-1 está localizada principalmente en los compartimentos autofágicos. El incremento de los niveles de p62 puede reflejar la ineficiente actividad autofágica causada por la infección con HSV-1 que se traduciría en un fallo en la degradación de p62.



5.1.4.3. HSV-1 no aumenta la degradación autofágica de proteínas.

La ejecución final de la autofagia conlleva la degradación de orgánulos y proteínas citosólicas englobadas dentro de las vesículas autofágicas. El método cuantitativo más utilizado para la medida del flujo autofágico es el análisis de la degradación de proteínas de vida media larga (Klionsky y cols., 2008). Con el fin de comprobar si nuestro modelo celular era competente en la ejecución del proceso autofágico, se cuantificó la degradación de proteínas de vida media larga en células SK-N-MC tratadas con rapamicina. El tratamiento con este inductor clásico de la autofagia incrementó la degradación de proteínas de vida media larga. Además, el incremento inducido por la rapamicina se revirtió con dos inhibidores de la autofagia, el 3-MA y una mezcla de inhibidores lisosomales (leupeptina/cloruro amónico) (Figura 18A). El análisis del efecto de la infección sobre la degradación de proteínas mostró que el porcentaje de degradación de

proteínas no se alteraba a lo largo de la infección ni tampoco se modificaba al aumentar la dosis viral de HSV-1 (Figura 18B). Así, HSV-1 es capaz de inducir una fuerte acumulación de autofagosomas que, sin embargo, no se traduce en un aumento de la degradación autofágica de proteínas.

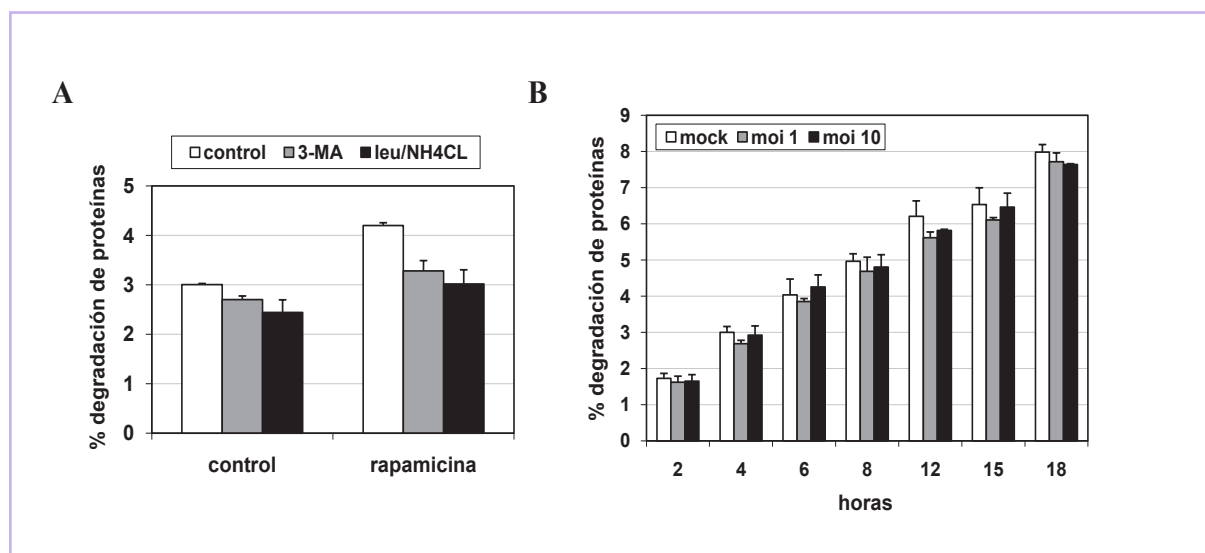


Figura 18. HSV-1 no aumenta la degradación de proteínas de vida media larga en las células SK-N-MC.

A) La gráfica representa el porcentaje de degradación de proteínas de vida media larga en células SK-N-MC sin tratar o tratadas con rapamicina y en presencia o ausencia de 3-MA e inhibidores lisosomales (leupeptina y cloruro amónico). **B)** Cuantificación del porcentaje de proteínas de vida media larga en células SK-N-MC infectadas con HSV-1 a una moi de 1 y 10 ufp por célula durante diferentes tiempos. Los datos revelan que HSV-1 no aumenta la degradación de proteínas y, por tanto, la ejecución de la autofagia. Las gráficas muestran las medias \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

5.1.4.4. Colocalización del marcador de autofagia LC3 con marcadores lisosomales/endosomales.

Para continuar con el análisis del flujo autofágico en las células infectadas con HSV-1, se evaluó mediante microscopía confocal la convergencia de la vía autofágica y el compartimento de degradación lisosomal. Uno de los métodos más utilizados para el estudio de la fusión de los autofagosomas con los lisosomas es la monitorización de la colocalización de LC3 y marcadores lisosomales. Para ello, se llevó a cabo un estudio de microscopía confocal en células SK-N-MC infectadas con HSV-1 utilizando anticuerpos que reconocen LC3 y la proteína de membrana lisosomal CD63 (Figura 19). En concordancia con resultados anteriores, el marcaje de la proteína LC3 endógena en las células control es indetectable mediante microscopía confocal, mientras que en las células infectadas con HSV-1 aparece un acusado patrón de marcaje ve-

sicular. El patrón de distribución de la proteína CD63 es prácticamente idéntico en las células mock y en las células infectadas con HSV-1 y no se observa colocalización con la proteína LC3. Además, con el fin de excluir que la falta de colocalización sea debida a una degradación rápida de LC3 por el compartimento lisosomal, se repitió el análisis confocal en presencia de inhibidores lisosomales. En estas condiciones, tampoco se detectó colocalización de LC3 y CD63. Estos resultados confirman la fusión ineficiente de los autofagosomas con los lisosomas y, en consecuencia, el fallo en la ejecución del proceso autofágico en las células SK-N-MC infectadas con HSV-1.

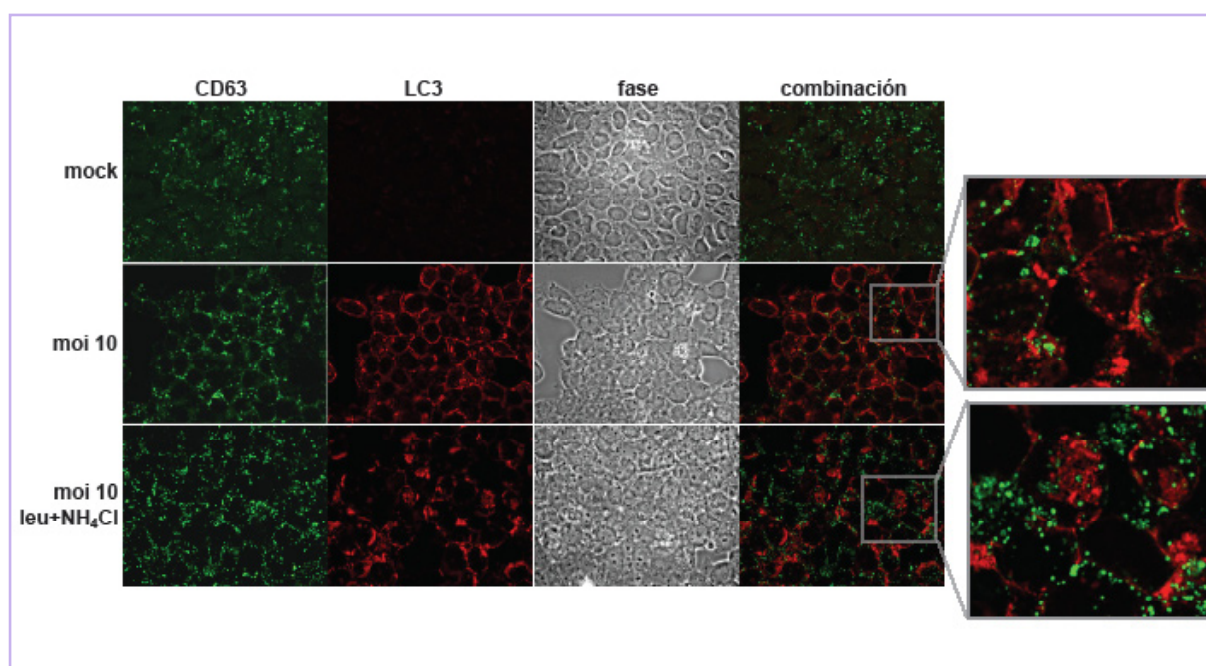


Figura 19. La proteína LC3 no colocaliza con CD63 en las células SK-N-MC infectadas con HSV-1. Análisis mediante microscopía confocal de células SK-N-MC infectadas con HSV-1 a una moi de 10 ufp por célula durante 18 horas en presencia o ausencia de inhibidores lisosomales (leupeptina y cloruro amónico). Se utilizaron anticuerpos que reconocen específicamente la proteína LC3 y el marcador lisosomal CD63. Se muestran las imágenes en contraste de fase. En los recuadros se aumenta un área de la imagen combinada de ambos marcajes en células infectadas sin tratar o tratadas con inhibidores lisosomales para mostrar la escasa colocalización de LC3 y CD63. Magnificación original 63x.

La vía endocítica es un sistema dinámico que desempeña un papel homeostático mediando la internalización, transporte, clasificación y degradación de macromoléculas (Mellman, 1996). Diferentes estudios han demostrado que los autofagosomas pueden fusionarse con endosomas tempranos o tardíos (Eskelinen, 2005), así como con los lisosomas, indicando que la maduración de los autofagosomas en los mamíferos es un proceso con múltiples pasos que incluyen la fusión

con distintas vesículas procedentes del compartimento endosomal/lisosomal. Por ello, se llevaron a cabo diferentes estudios de microscopía confocal para analizar la presencia de marcadores endosomales en las vesículas LC3 positivas inducidas por la infección con HSV-1.

En primer lugar, se analizó el patrón de distribución del marcador de endosomas tempranos EEA1 (antígeno endosomal temprano 1) y la proteína LC3. En las células sin infectar, la señal de la proteína LC3 endógena es indetectable. Sin embargo, EEA1 presenta un patrón de fluorescencia punteado citoplasmático tanto en las células control como en las células infectadas con HSV-1 a 8 y 18 horas característico del compartimento endosomal. Aunque la inmunorreactividad de LC3 endógeno aumenta notablemente cuando las células son infectadas con HSV-1, hay un bajo nivel de colocalización con el marcador EEA1, como se aprecia en la imagen combinada de ambos marcajes (Figura 20).

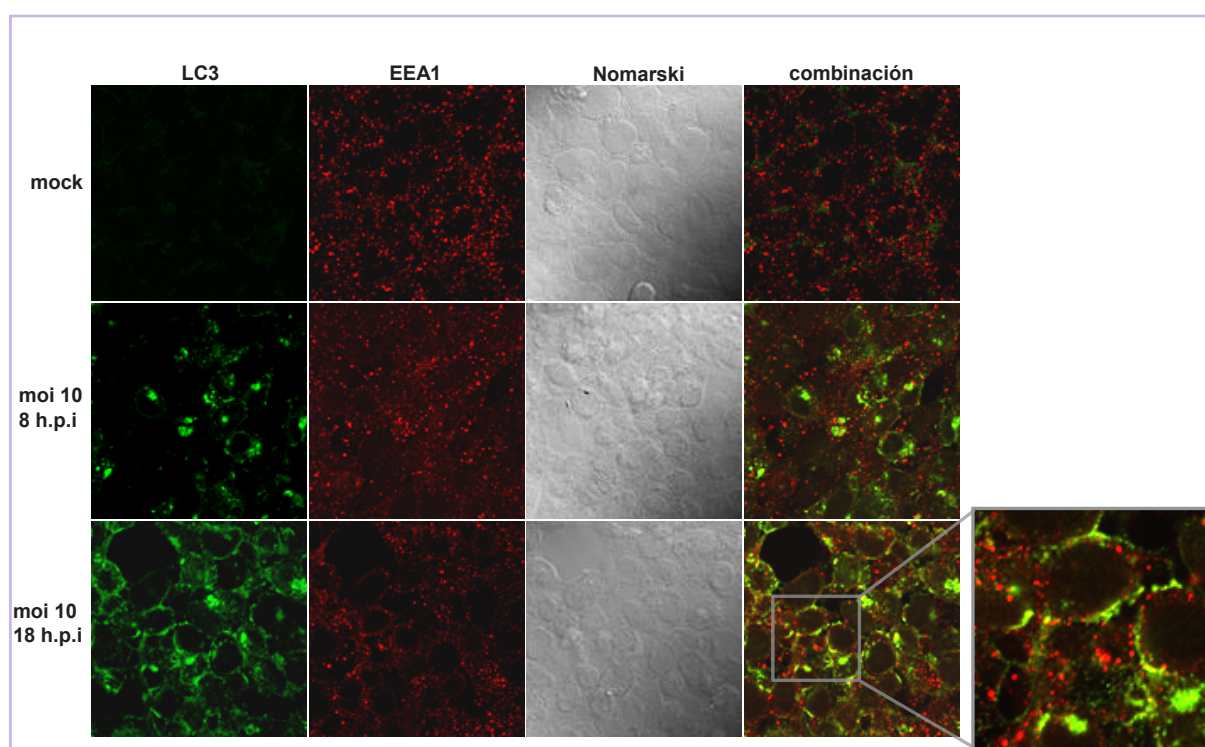


Figura 20. La proteína LC3 endógena no colocaliza con el marcador de endosomas tempranos EEA1.

Las células SK-N-MC fueron infectadas con HSV-1 a una moi de 10 ufp por célula durante 8 y 18 horas y se analizaron por microscopía confocal empleando anticuerpos anti-EEA1 y anti-LC3. Se muestran las imágenes de microscopía de Nomarski. Las imágenes combinadas muestran el marcaje de LC3 y EEA1. La imagen aumentada revela que LC3 y EEA1 no colocalizan en las células infectadas con HSV-1. Magnificación original 63x.

A continuación, se analizó el patrón de distribución del marcador de endosomas tardíos CD222 en células SK-N-MC infectadas con HSV-1 por microscopía confocal. CD222 es una proteína transmembrana que se encuentra mayoritariamente en los compartimentos endosomales tardíos actuando como receptor de la manosa 6 fosfato e IGF-II (insulin-like growth factor II). En las células SK-N-MC control e infectadas con HSV-1, CD222 presenta un marcaje concentrado en el citoplasma celular. En consonancia con experimentos anteriores, la proteína LC3 presenta un patrón de distribución concentrado correspondiente con la acumulación de vesículas autofágicas en las células infectadas con HSV-1. Al analizar la imagen combinada de ambos marcajes, se observa una colocalización muy elevada de LC3 y CD222, como indica el marcaje amarillo en la figura aumentada (Figura 21).

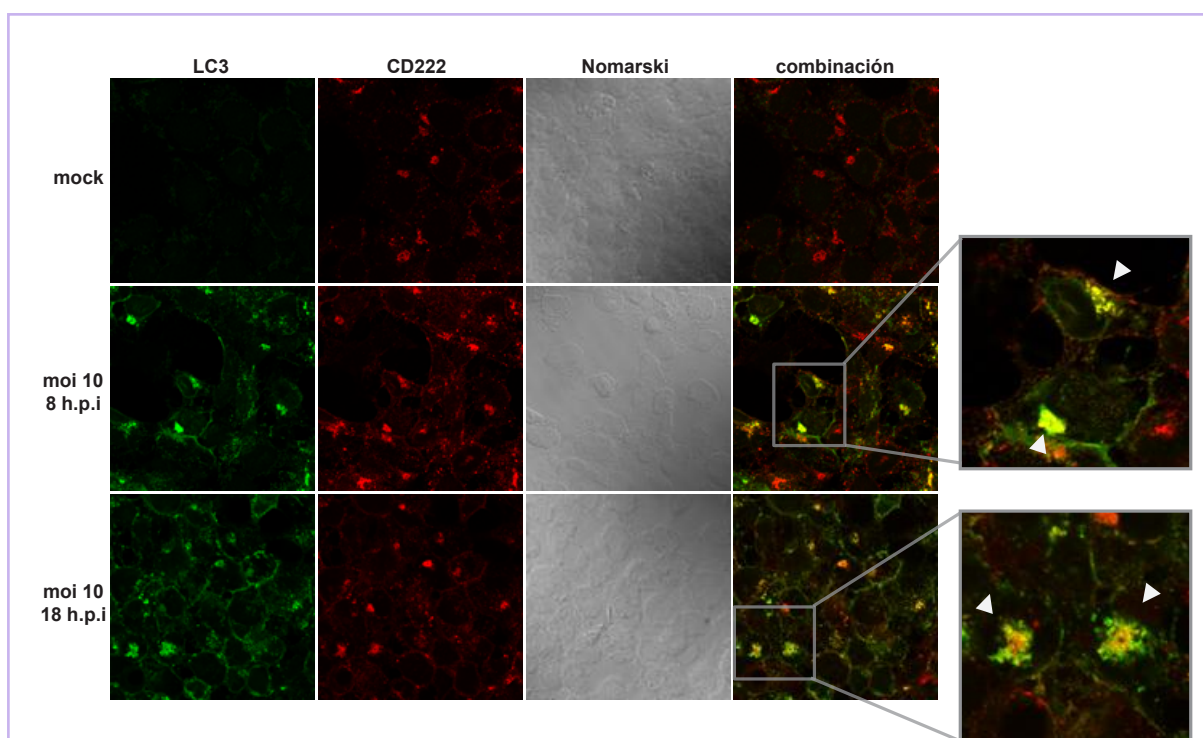


Figura 21. Colocalización de la proteína LC3 endógena con CD222 en células SK-N-MC infectadas con HSV-1. Análisis mediante microscopía confocal de células SK-N-MC infectadas con HSV-1 a una moi de 10 ufp por célula durante 8 y 18 horas utilizando anticuerpos específicos contra LC3 y CD222. El análisis del patrón de distribución de la proteína LC3 y CD222 muestra la colocalización de ambos marcajes en las mismas estructuras subcelulares. Se muestran las imágenes de microscopía de Nomarski. Magnificación original 63x. En el recuadro se detalla la combinación de ambos marcajes en células infectadas con HSV-1 para resaltar la colocalización (señalada por puntas de flechas) de LC3 y CD222.

Estos resultados indican que las estructuras autofágicas LC3 positivas contienen marcadores de endosomas tardíos pero no marcadores lisosomales o de endosomas tempranos sugiriendo la existencia de eventos de fusión de vesículas autofágicas con endosomas tardíos en las células infectadas con HSV-1.

5.1.4.5. Monitorización de vesículas autofágicas mediante microscopía electrónica.

La microscopía electrónica es uno de los métodos más antiguos y sin embargo más fiables para la monitorización de la autofagia. Para caracterizar los compartimentos autofágicos inducidos por la infección con HSV-1, se realizó un experimento donde las células SK-N-MC infectadas con HSV-1 durante 18 horas fueron examinadas al microscopio electrónico. En las células sin infectar raramente se detectan los distintos compartimentos autofágicos característicos (Figura 22A). Por el contrario, en las células infectadas con HSV-1 se observan fagóforos y numerosos autofagosomas, identificados como estructuras vesiculares de doble membrana con contenido citoplasmático en su interior. Sin embargo, no se observan autolisosomas con material citosólico en degradación (Figura 22B). También se observan en las células infectadas con HSV-1 estructuras de cuatro membranas cercanas al núcleo (Figura 22C). Estas estructuras guardan semejanza con los autofagosomas de cuatro membranas descritos por otros autores (English y cols., 2009). Estos resultados son consistentes con los obtenidos en los experimentos de degradación de proteínas, reforzando la hipótesis de la inducción de un proceso autofágico por la infección con HSV-1 y la posterior inhibición en etapas tardías de la infección.

Evidencias recientes sustentan la existencia de una posible degradación autofágica del virus HSV-1 (Talloczy y cols., 2006; Alexander y cols., 2007; English y cols., 2009). Al investigar esta posibilidad, se detectaron muy pocos autofagosomas con partículas virales en su interior en las células SK-N-MC infectadas con HSV-1. La mayoría de los viriones estaban distribuidos libremente en el citoplasma o dentro de vesículas citoplasmáticas con una única membrana (Figura 22B y 22C). Estos datos confirman que la infección con HSV-1 induce la acumulación de autofagosomas tanto clásicos como de cuatro membranas, y que la degradación autofágica de HSV-1, si ocurre, no es muy importante en las células de neuroblastoma humano.

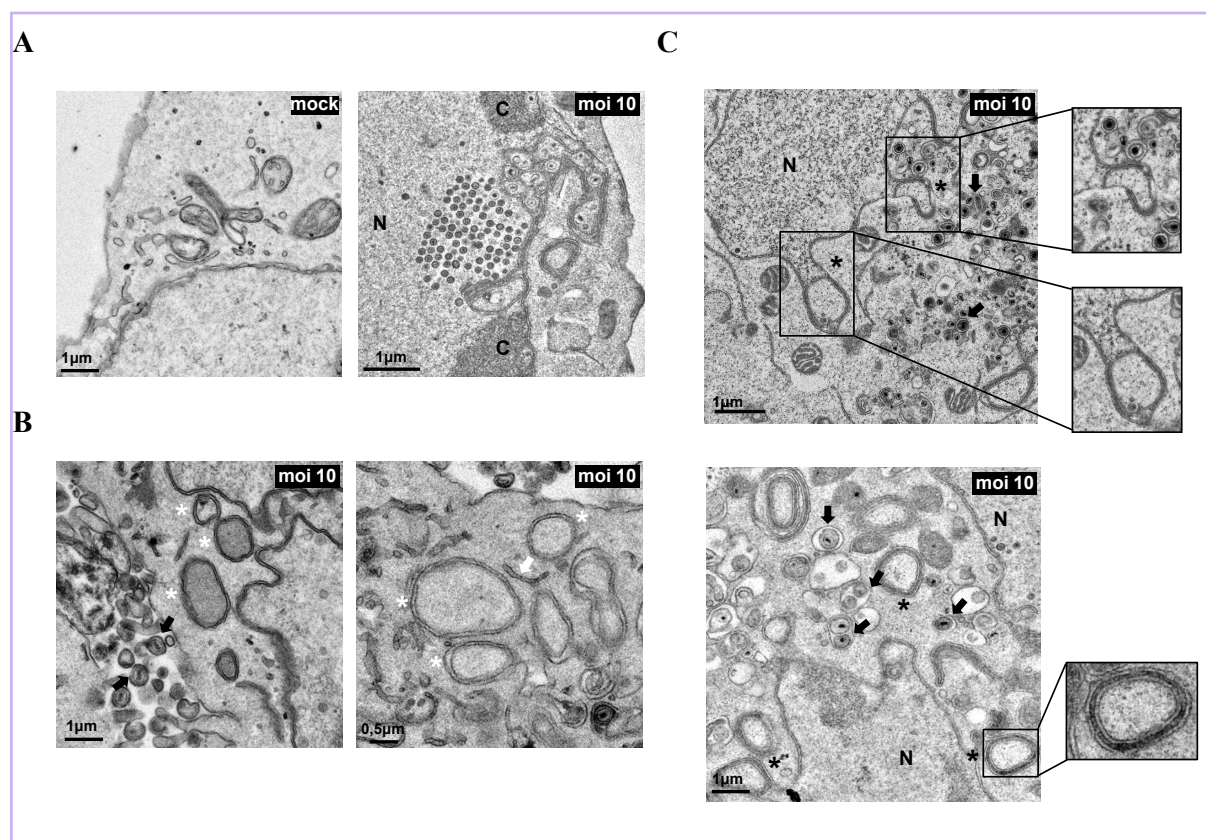


Figura 22. Análisis mediante microscopía electrónica de células SK-N-MC infectadas con HSV-1. A) Imágenes representativas de una célula control y una infectada con HSV-1 a una moi de 10 ufp por célula durante 18 horas. En la célula infectada se observa la cromatina condensada (C) y un cristal de virus en una protusión del núcleo (N). **B)** Análisis de los compartimentos autofágicos inducidos por la infección con HSV-1 de células SK-N-MC. En las fotografías se detallan fagóforos (flechas blancas) y autofagosomas (asteriscos blancos). También se observan numerosas vesículas con partículas virales en su interior así como viriones libres en el citoplasma (flechas negras). **C)** Imágenes de células SK-N-MC infectadas con HSV-1 a una moi de 10 ufp por célula durante 18 horas que muestran la presencia de autofagosomas incipientes con cuatro membranas incipientes a partir de la membrana nuclear (panel superior) o liberados en el citoplasma (panel inferior) (asteriscos negros). El área recuadrada está aumentada para visualizar los autofagosomas de cuatro membranas con mayor detalle.

5.1.4.6. Colocalización de la proteína LC3 endógena y la glicoproteína gC de HSV-1.

Recientemente, se ha descrito la existencia de un tipo de autofagia nuclear inducida por HSV-1 que podría participar en la presentación de antígenos virales mediante el MHC de clase I (English y cols., 2009). La presencia de autofagosomas de cuatro membranas característica de este tipo de autofagia sugería que este proceso podría estar ocurriendo en células SK-N-MC infectadas con HSV-1.

Para investigar si este tipo de autofagia tenía lugar en nuestro modelo, se realizaron ensayos de microscopía confocal en células SK-N-MC infectadas con HSV-1 y se analizó el marcaje de la proteína LC3 y la glicoproteína viral gC. En las células sin infectar, el marcaje de ambas proteínas es indetectable. Por el contrario, en etapas tempranas de la infección (8 h.p.i) el marcaje de la glicoproteína viral gC colocaliza intensamente con la proteína LC3 endógena, indicando que ambas proteínas se encuentran en la misma estructura subcelular. En las etapas finales de la infección (18 h.p.i), el marcaje de la proteína gC cambia de patrón de distribución siendo menos concentrado y más asociado a la membrana plasmática, disminuyendo el grado de colocalización con la proteína LC3 endógena (Figura 23). La localización de gC en vesículas autofágicas en estadios tempranos de la infección sugiere que gC podría ser procesada por la vía autofágica para su posterior presentación por el MHC de clase I, reforzando la existencia de una autofagia nuclear en células neuronales infectadas con HSV-1.

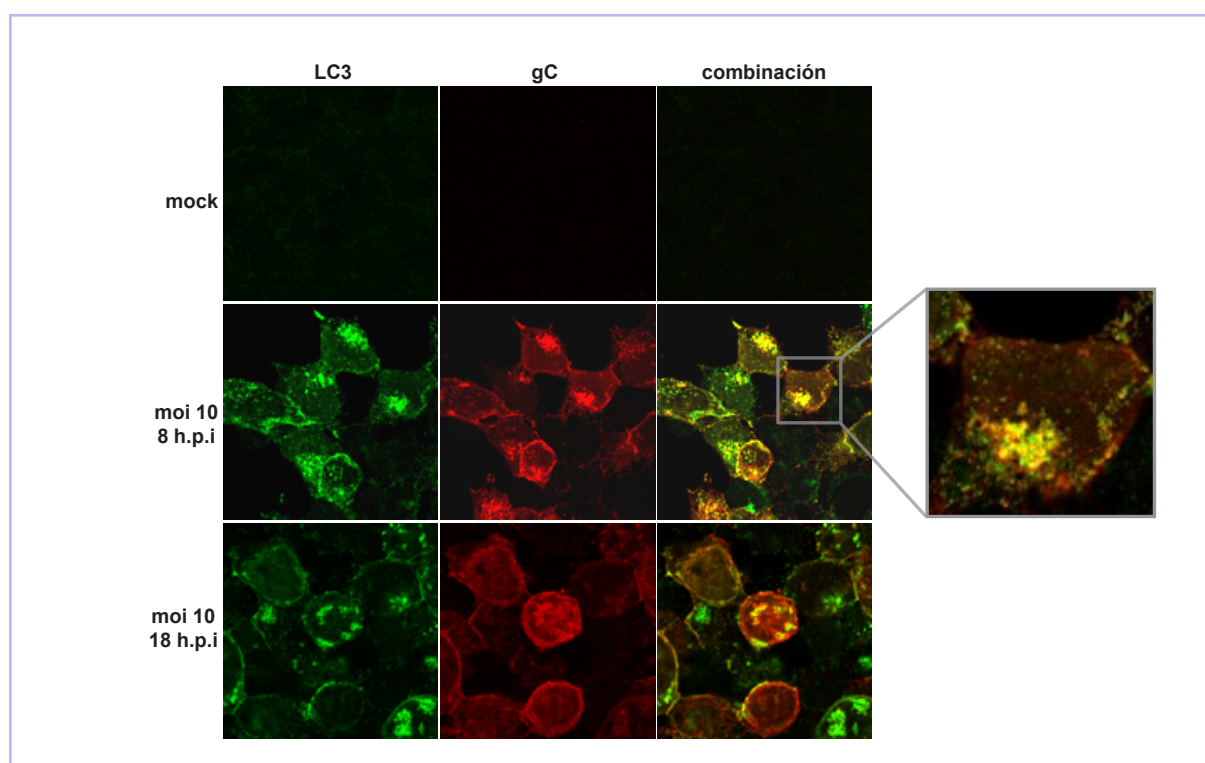
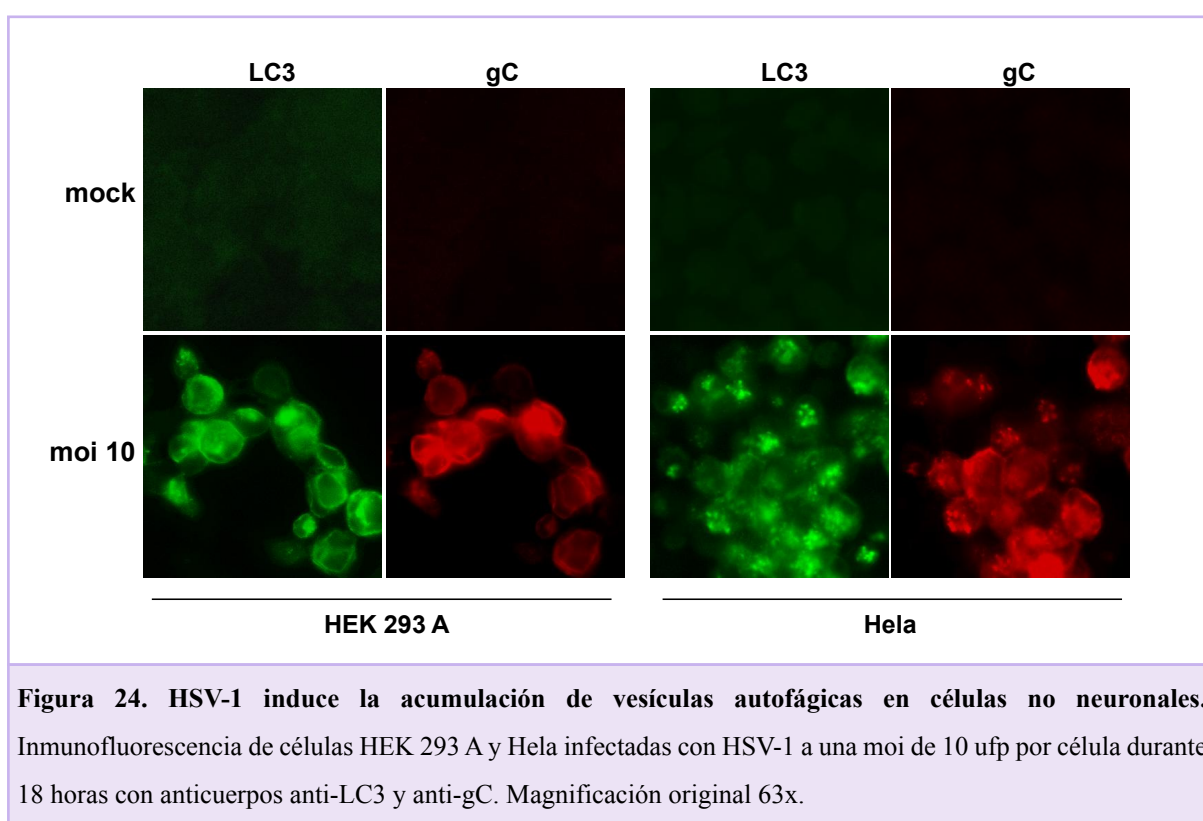


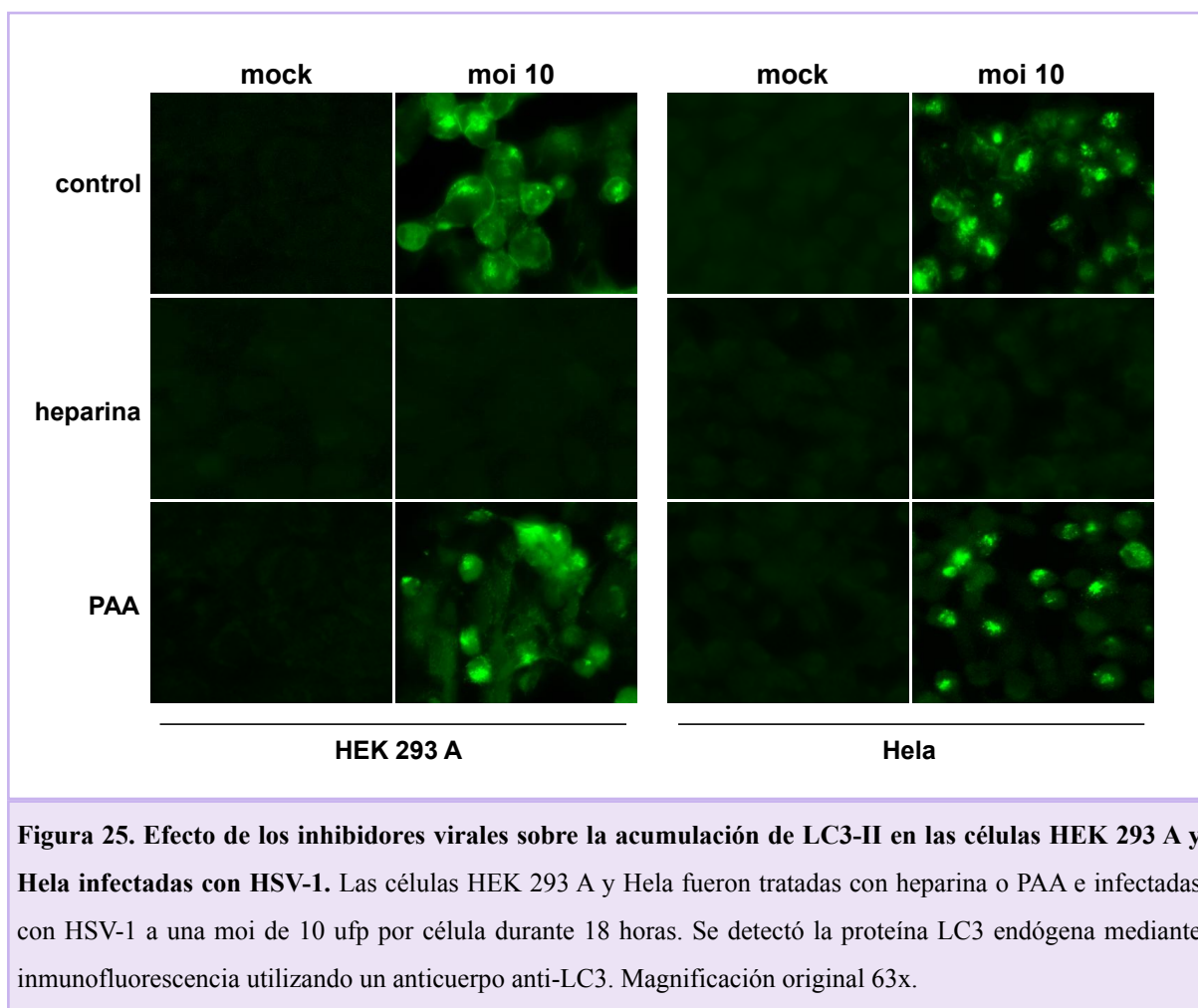
Figura 23. Las proteínas gC y LC3 se acumulan en la misma estructura subcelular durante la infección con HSV-1. Análisis mediante microscopía confocal de células SK-N-MC infectadas con HSV-1 a una moi de 10 ufp por célula durante 8 y 18 horas con anticuerpos específicos anti-LC3 y anti-gC. Como se observa en el área aumentada, el patrón de distribución de ambas proteínas colocaliza especialmente a tiempos tempranos de infección. Magnificación original 100x.

5.1.5. HSV-1 INDUCE UNA ACUMULACIÓN DE AUTOFAGOSOMAS EN CÉLULAS NO NEURONALES.

El HSV-1 es un virus neurotrópico pero es capaz de infectar y replicarse de manera eficiente en un gran número de tipos celulares. Para comprobar que la acumulación de autofagosomas observada en la línea de neuroblastoma humano SK-N-MC era reproducible en otros tipos celulares, se analizó el efecto de la infección sobre dos líneas celulares de origen epitelial, HEK 293 A y Hela, mediante estudios de inmunofluorescencia. En la figura 24, se muestra que la infección con HSV-1 también induce una acumulación de vesículas autofágicas en ambas líneas celulares.



Del mismo modo, se comprobó la especificidad de la acumulación de los autofagosomas inducida por la infección con HSV-1 mediante el uso de inhibidores virales. Como ocurría en las células neuronales, la heparina, pero no el PAA, evitó la acumulación de vesículas autofágicas en células HEK 293 A y Hela infectadas con HSV-1 (Figura 25).



Finalmente, se examinó la existencia de un fallo en la fusión entre las vesículas autofágicas y los lisosomas en las células HEK 293 A y Hela infectadas con HSV-1. El análisis mediante microscopía confocal no detectó colocalización de la proteína LC3 con el marcador lisosomal CD63, sugiriendo que la infección con HSV-1 está alterando del mismo modo que en las células SK-N-MC la ejecución del proceso autofágico. Además, el tratamiento con inhibidores lisosomales demostró que la ausencia de colocalización no era debida a una degradación eficaz de LC3, ya que el análisis de células tratadas con leupeptina y cloruro amónico también reveló la ausencia de colocalización entre la proteína LC3 y CD63 (Figura 26).

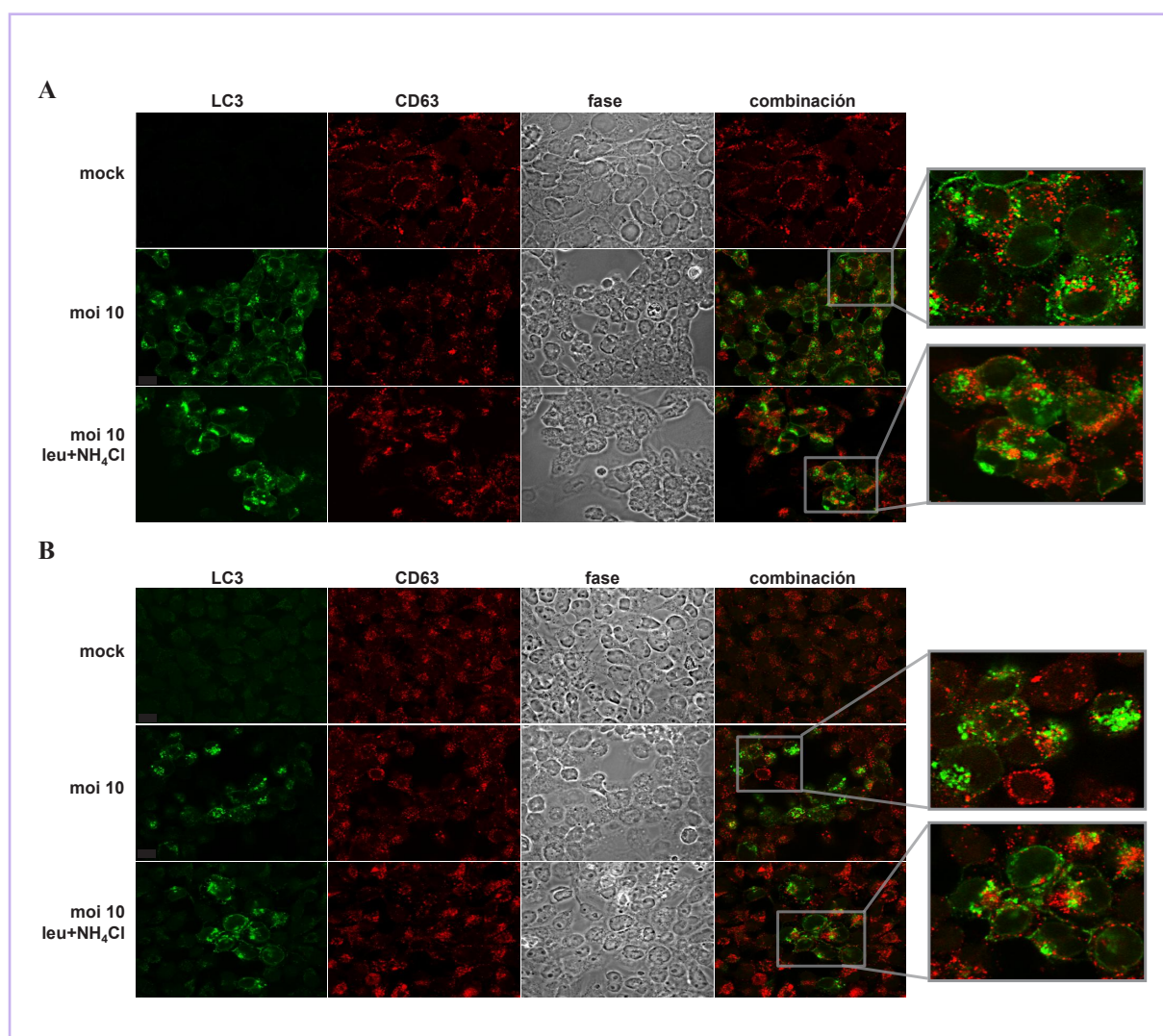


Figura 26. La proteína LC3 no colocaliza con CD63 en las células HEK 293 A y Hela infectadas con HSV-1. Análisis mediante microscopía confocal de células HEK 293 A (**A**) y Hela (**B**) infectadas con HSV-1 a una moi de 10 ufp por célula durante 18 horas en presencia o ausencia de inhibidores lisosomales (leupeptina y cloruro amónico). Se utilizaron anticuerpos que reconocen específicamente la proteína LC3 y el marcador lisosomal CD63. Se muestran las imágenes en contraste de fase. En los recuadros se aumenta un área de la imagen combinada de ambos marcajes en células infectadas sin tratar o tratadas con inhibidores lisosomales para mostrar en mayor detalle la escasa colocalización de LC3 y CD63. Magnificación original 63x.

Todos estos datos indican que la alteración del proceso autofágico inducida por HSV-1 es un fenómeno general que tiene lugar en diferentes tipos celulares como consecuencia de la infección.

5.1.6. LA INHIBICIÓN DE LA AUTOFAGIA NO AFECTA A LA EFICIENCIA DE LA INFECCIÓN CON HSV-1.

Con el fin de determinar si la acumulación de vesículas autofágicas en células infectadas tenía algún efecto en la eficiencia de la infección con HSV-1, se examinó mediante inmunocitoquímica el efecto de la transducción con Ad-shATG5 sobre el número de células infectadas. Como muestran las imágenes de inmunofluorescencia, tras una infección con HSV-1 durante 18 horas tanto los cultivos transducidos como los no transducidos con Ad-shATG5 están totalmente infectados, como demuestra el marcaje de las células con el anticuerpo anti-HSV-1 que reconoce varias proteínas virales (Figura 27).

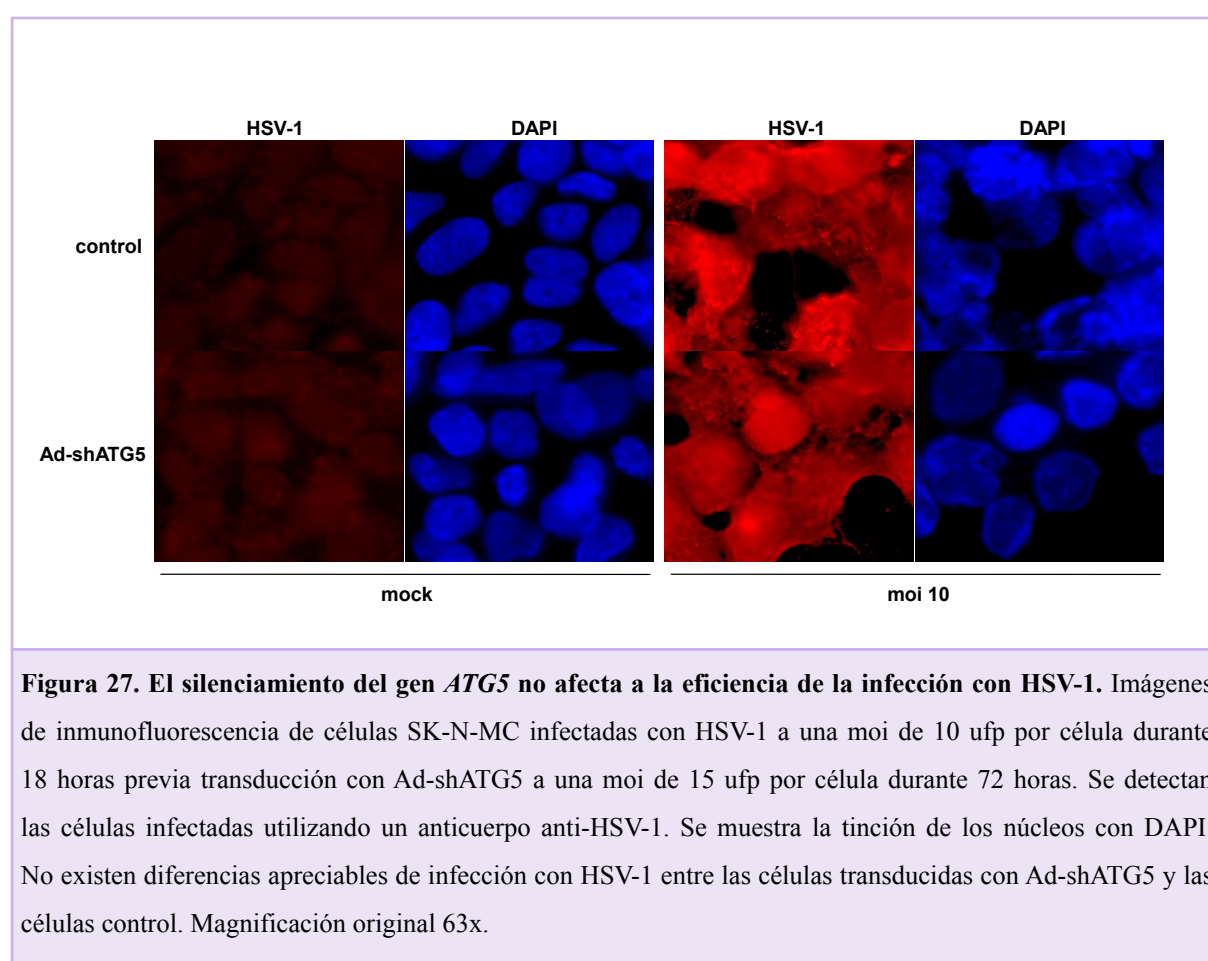


Figura 27. El silenciamiento del gen *ATG5* no afecta a la eficiencia de la infección con HSV-1. Imágenes de inmunofluorescencia de células SK-N-MC infectadas con HSV-1 a una moi de 10 ufp por célula durante 18 horas previa transducción con Ad-shATG5 a una moi de 15 ufp por célula durante 72 horas. Se detectan las células infectadas utilizando un anticuerpo anti-HSV-1. Se muestra la tinción de los núcleos con DAPI. No existen diferencias apreciables de infección con HSV-1 entre las células transducidas con Ad-shATG5 y las células control. Magnificación original 63x.

Para analizar de un modo cuantitativo el efecto de la inhibición de la autofagia en la infección con HSV-1, se analizó la expresión de proteínas virales, la replicación del DNA viral y el título viral en etapas tardías de la infección (18 h.p.i). En primer lugar, se determinaron los niveles de expresión de la proteína del tegumento de HSV-1, VP16, mediante WB empleando un anticuerpo anti-VP16 (figura 28A). De acuerdo con los resultados de la inmunofluorescencia, la

transducción con Ad-shATG5 o el adenovirus control Ad-shLAM no interfiere en la infección con HSV-1 al detectarse los mismos niveles de VP16 en presencia o ausencia de ambos adenovirus. Al mismo tiempo de infección, no se observa un efecto inhibitor de la replicación viral en las células transducidas con Ad-shATG5 mediante cuantificación por PCR cuantitativa del DNA viral (Figura 28B). Finalmente, tampoco se observan diferencias significativas entre los títulos virales en cultivos transducidos con Ad-shATG5 y los cultivos sin transducir o transducidos con el adenovirus control Ad-shLAM (Figura 28C). Todos estos resultados indican que la ausencia de *ATG5*, y por tanto de la actividad autofágica, no ejerce ningún efecto sobre el crecimiento de HSV-1 en células de neuroblastoma humano.

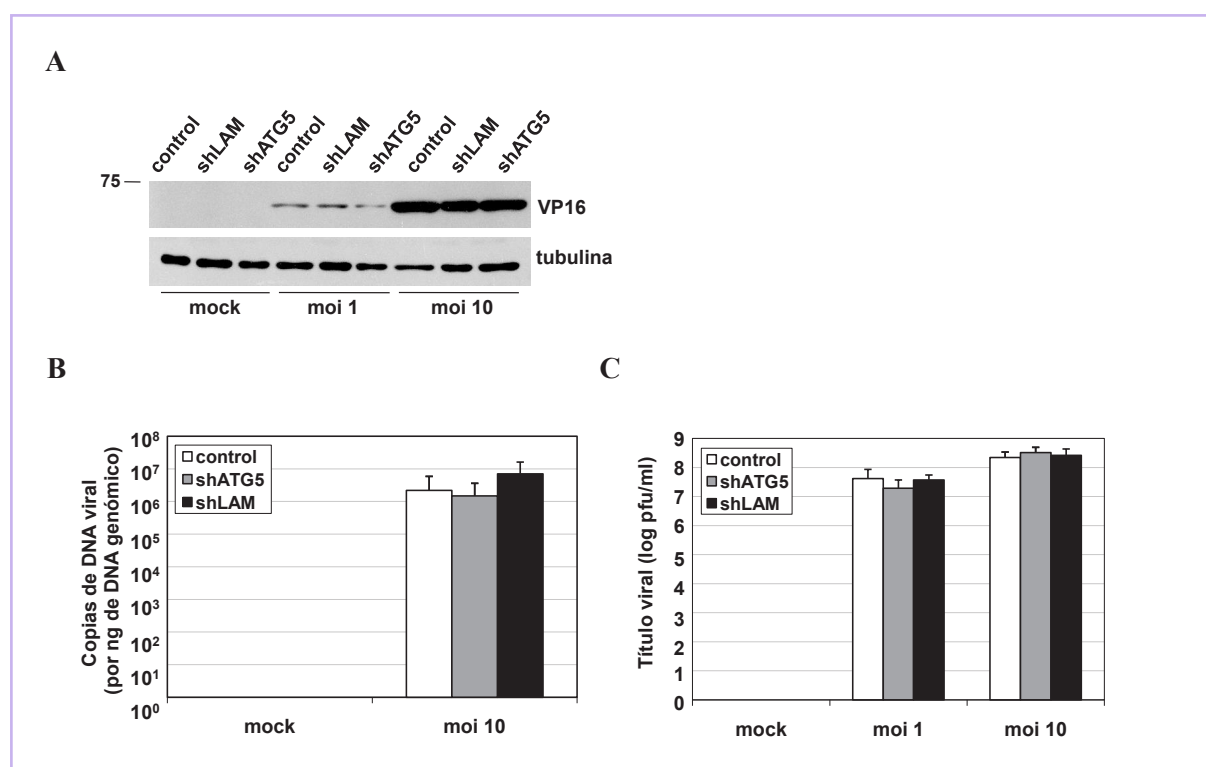


Figura 28. El silenciamiento de ATG5 no afecta a la replicación de HSV-1. Las células SK-N-MC fueron transducidas con Ad-shATG5 o Ad-shLAM a una moi de 15 ufp por célula durante 72 horas y, posteriormente, infectadas con HSV-1 a una moi de 1 y 10 ufp durante 18 horas. **A)** Análisis por WB de los lisados celulares con un anticuerpo específico de VP16. La transducción con Ad-shATG5 no tiene efecto en los niveles de VP16. Se muestra un experimento representativo de 4 realizados. La tubulina se muestra como control de carga de proteína. **B)** Cuantificación del DNA viral mediante PCR cuantitativa. Los resultados se representan como copias de DNA de HSV-1 por ng de DNA genómico. En la gráfica se representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos realizados por triplicado. **C)** Determinación del título viral mediante ensayo de placa. Los datos mostrados equivalen a la media \pm desviación estándar de tres experimentos realizados por triplicado.

5.2. LA INFECCIÓN CON HSV-1 ALTERA EL PROCESAMIENTO DE APP CAUSANDO LA ACUMULACIÓN DEL PÉPTIDO A β INTRACELULAR.

5.2.1. HSV-1 INDUCE UN AUMENTO DE LOS NIVELES DEL PÉPTIDO A β INTRACELULAR.

La autofagia ha sido definida como una de las vías implicadas en la generación del péptido A β (Yu y cols., 2004b; Nixon y cols., 2005). Dado que nuestros resultados indican que HSV-1 induce la acumulación de vesículas autofágicas, se analizó si la infección con HSV-1 producía un aumento de los niveles del péptido A β intracelular. Debido a que las células de neuroblastoma humano SK-N-MC producen niveles muy bajos del péptido A β , se utilizó como modelo celular de infección una línea celular que expresa establemente la proteína APP humana que fue generada en nuestro laboratorio (Carballal, 2003; Recuero y cols., 2004). De las diferentes líneas celulares generadas, en este estudio se ha utilizado la línea celular C2, a la que se referirá como SK-APP.

Se realizó un primer experimento donde se evaluó por inmunocitoquímica los niveles intracelulares del péptido A β en las células SK-APP infectadas con HSV-1 empleando dos anticuerpos específicos de especie, M40 y M42 que reconocen los péptidos A β 40 y A β 42 respectivamente (Figura 29). La inmunorreactividad de A β es indetectable en células SK-APP sin infectar. La infección con HSV-1 induce la aparición de un fuerte marcaje concentrado en determinadas zonas tanto del péptido A β 40 como del A β 42. Cuando la infección se efectuó en condiciones más cercanas a la infección fisiológica (moi 0.1 ufp por célula durante 48 horas), se confirmó la acumulación intracelular del péptido A β .

A la vista de los resultados obtenidos y con el fin de excluir uniones inespecíficas o una reactividad cruzada con APP, se realizó una segunda inmunocitoquímica en células SK-APP infectadas con HSV-1, empleando diferentes anticuerpos específicos de especie, que reconocen el péptido A β 42 (M42, IBL42), y el péptido A β 40 (M40, QCB40), así como los anticuerpos 6E10 y 4G8 que reconocen ambas isoformas (figura 30). Los resultados indican, con todos los anticuerpos testados, que la infección con HSV-1 induce un marcado aumento de los niveles del péptido A β , tanto de 40 como de 42 aminoácidos.

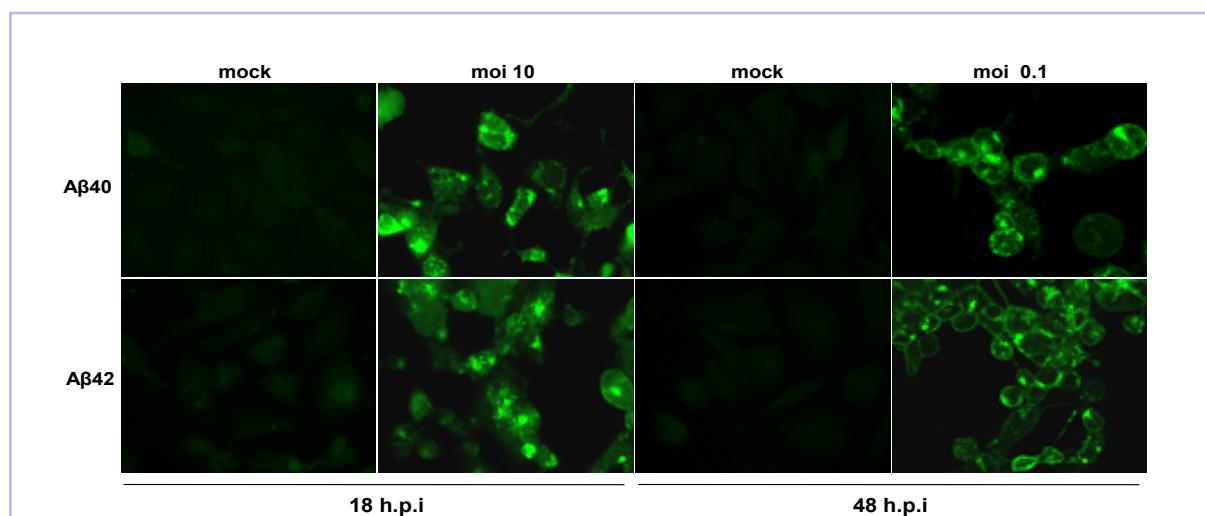


Figura 29. HSV-1 induce un aumento de los niveles del péptido Aβ intracelular en las células SK-APP. Análisis mediante inmunocitoquímica de células SK-APP sin infectar (mock) e infectadas con HSV-1 a una moi de 10 y 0.1 ufp por célula durante 18 y 48 horas respectivamente, empleando los anticuerpos específicos de los péptidos Aβ40 y Aβ42. Magnificación original 63x.

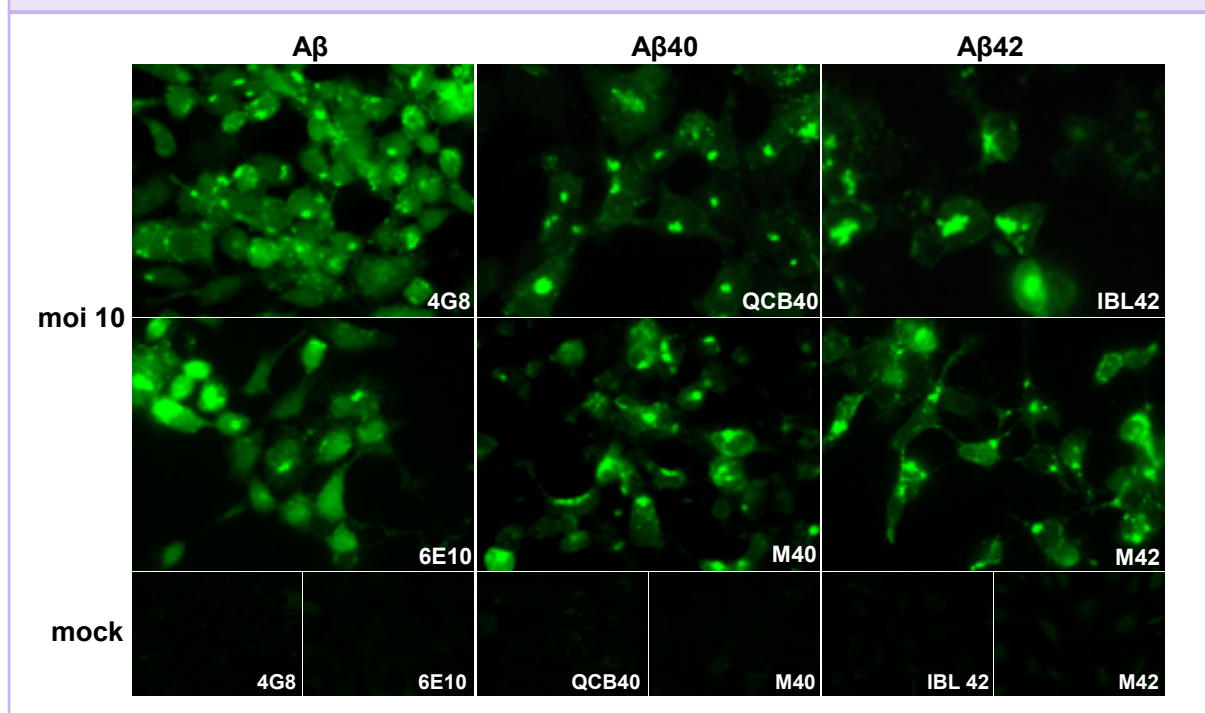


Figura 30. HSV-1 induce la acumulación del péptido Aβ intracelular. Análisis mediante inmunocitoquímica de células SK-APP sin infectar (mock) e infectadas con HSV-1 a una moi de 10 ufp por célula durante 18 horas empleando distintos anticuerpos que reconocen las distintas especies del péptido Aβ. Magnificación original 63x.

Para determinar si el aumento de los niveles de A β tenía lugar en células infectadas, llevamos a cabo una serie de ensayos de inmunofluorescencia doble. Los resultados revelan que el incremento de A β 40 y A β 42 ocurre en las células infectadas con HSV-1, las cuáles son identificadas con un anticuerpo que reconoce gC, una glicoproteína de la envoltura de HSV-1 (Figura 31).

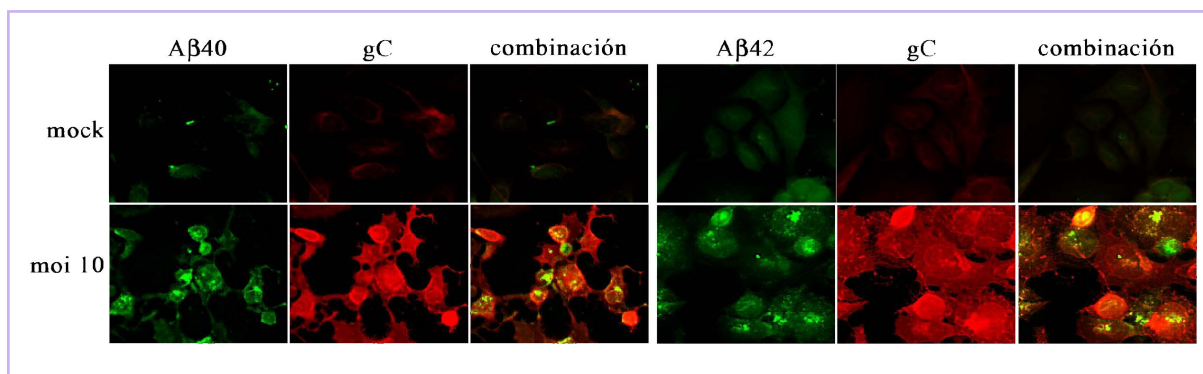


Figura 31. El péptido A β se acumula en las células infectadas con HSV-1. Las células SK-APP fueron infectadas a una moi de 10 ufp por célula durante 18 horas. Las imágenes de fluorescencia muestran que los péptidos A β 40 y A β 42 se detectan en las células marcadas con un anticuerpo que reconoce la glicoproteína gC. Magnificación original 63x.

Continuando la caracterización de la acumulación de A β intracelular, se llevó a cabo una cinética de infección en las células SK-APP y se analizó mediante inmunofluorescencia el marcaje del péptido A β . Como se muestra en la figura 32, la aparición del péptido A β tiene lugar en etapas muy tempranas de la infección, detectándose a las 2 h.p.i.

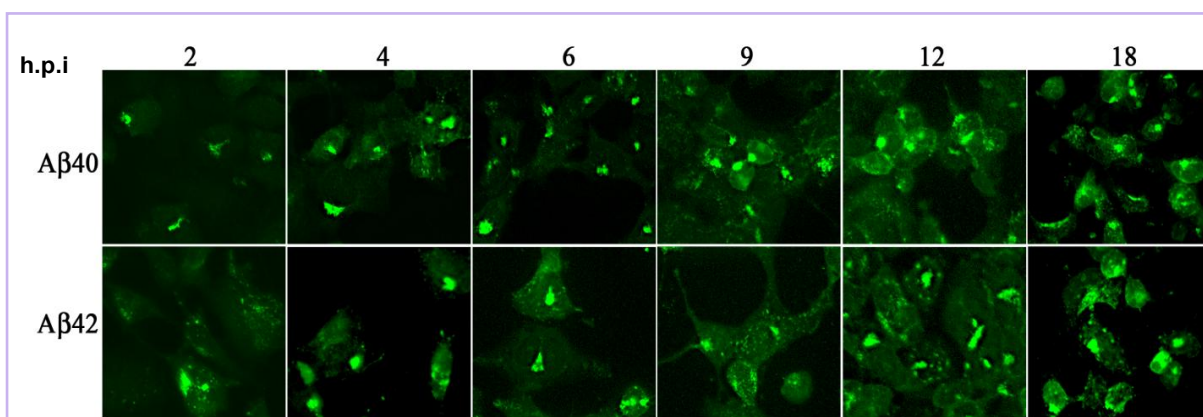


Figura 32. Análisis de los niveles de A β a diferentes tiempos de infección. Se analizó el marcaje de A β 40 y A β 42 mediante inmunofluorescencia a 2, 4, 6, 9, 12 y 18 h.p.i en células SK-APP infectadas con HSV-1 a una moi de 10 ufp por célula. Las imágenes muestran que los niveles del péptido A β intracelular aumentan con el tiempo de infección.

Para confirmar que el aumento de los niveles del péptido A β intracelular es debido específicamente a la infección con HSV-1, las células SK-APP fueron tratadas con dos inhibidores de la infección de HSV-1: la heparina, inhibidor de la entrada de HSV-1, y el PAA, inhibidor de la DNA polimerasa viral (Figura 33). En el ensayo de inmunocitoquímica se observa que el tratamiento con heparina inhibe totalmente la acumulación de las dos isoformas del péptido A β intracelular, mientras que el PAA aparentemente no tiene ningún efecto, indicando que la acumulación de A β es independiente de la replicación viral. Este dato es consistente con la acumulación temprana de A β en células infectadas (2 h.p.i), antes del inicio de la replicación viral.

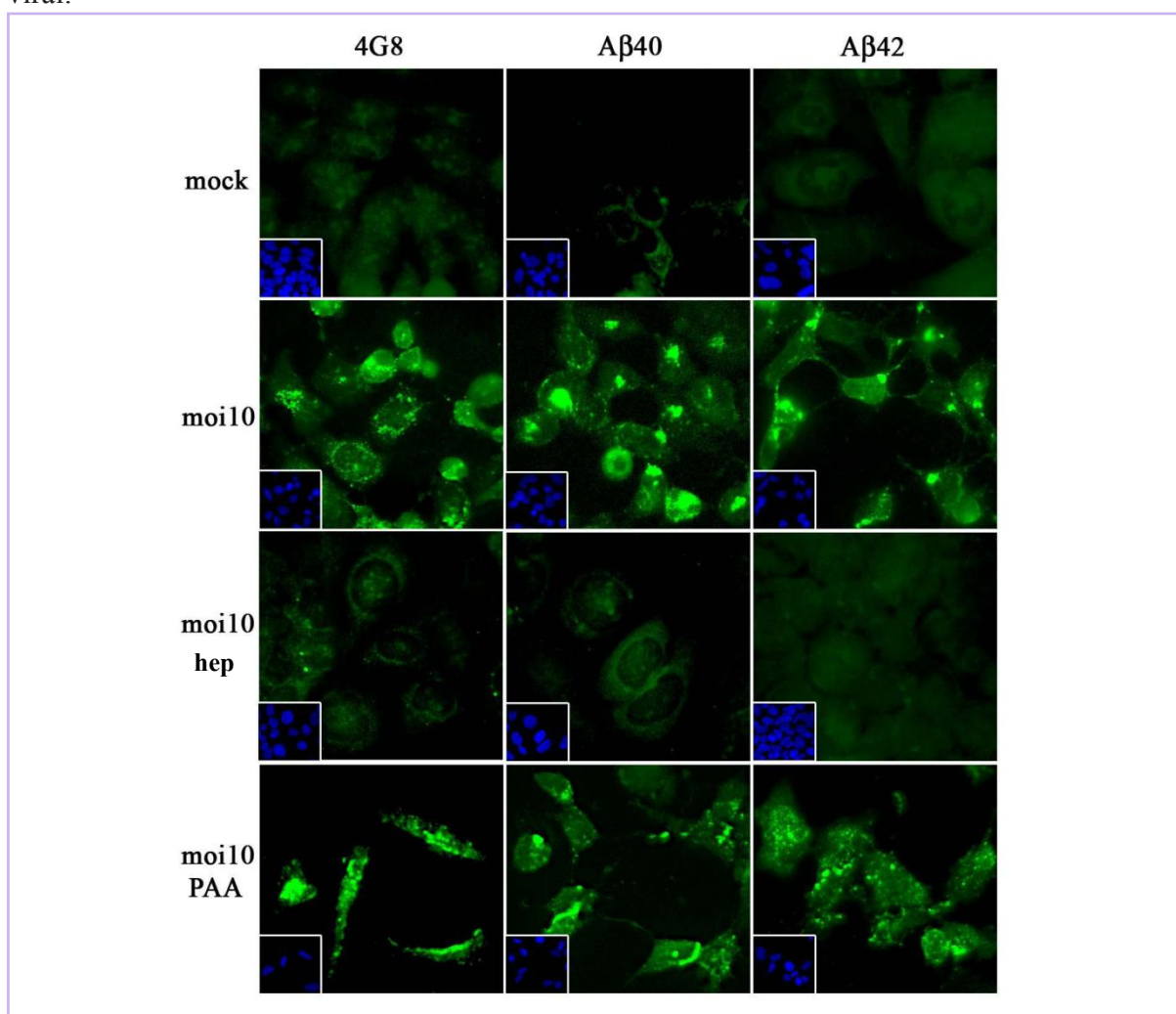
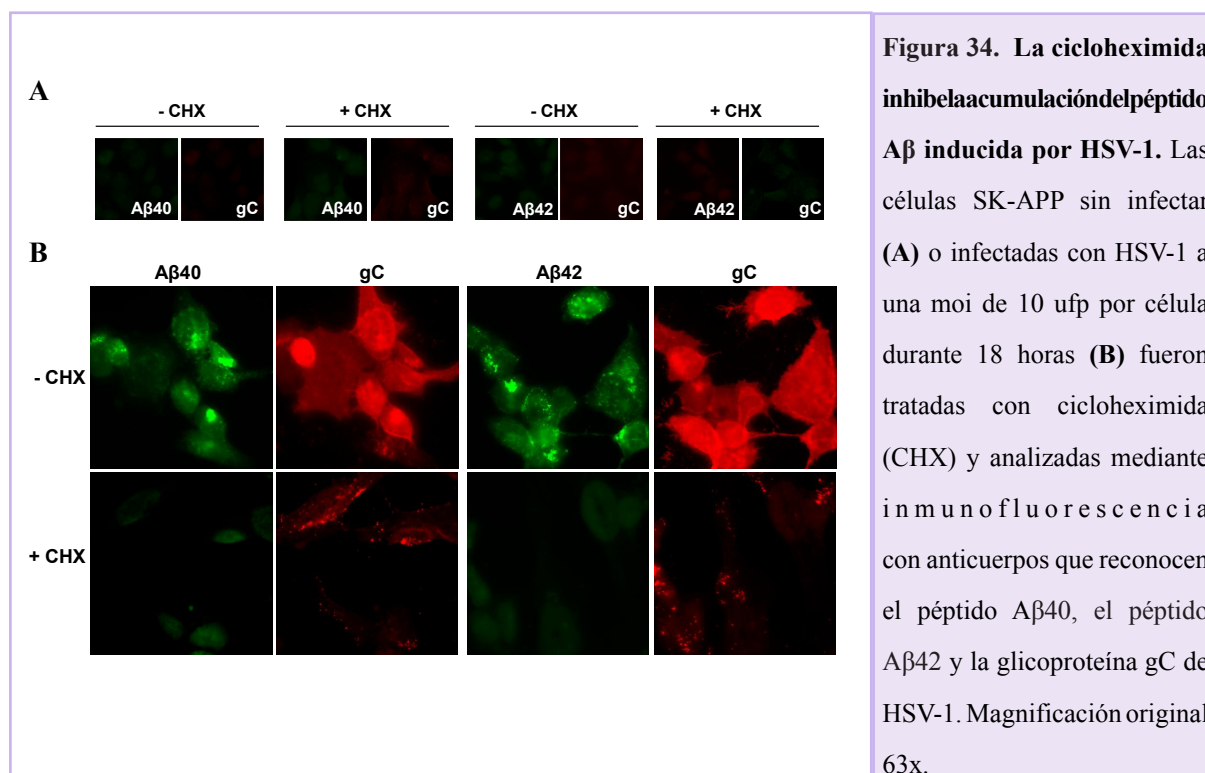


Figura 33: Efecto de la inhibición de la infección sobre la acumulación de A β inducida por HSV-1. Las células SK-APP fueron infectadas a una moi de 10 ufp por célula durante 18 horas en presencia o ausencia de heparina y PAA, y analizadas mediante inmunofluorescencia usando distintos anticuerpos anti-A β . La heparina, y no el PAA, inhibe la acumulación de A β inducida por la infección con HSV-1. Los recuadros muestran la tinción de los núcleos con DAPI. Magnificación original 63x.

El análisis mediante inmunocitoquímica de las células SK-APP tratadas con cicloheximida reveló que, al igual que ocurría con la acumulación de las vesículas autofágicas, el incremento de ambas isoformas del péptido A β era dependiente de la síntesis de proteínas virales. Como se muestra en la figura 34, el tratamiento con cicloheximida inhibió totalmente la inmunorreactividad del péptido A β , siendo indetectable en las células infectadas.



A continuación, con el fin de cuantificar la acumulación de A β 40 y A β 42 observada mediante ensayos de inmunofluorescencia, se evaluaron los niveles de A β en los lisados celulares de SK-APP infectadas con HSV-1 a 18 y 48 horas mediante ensayos de ELISA, utilizando anticuerpos específicos de las especies A β 40 y A β 42. Tras la normalización por la cantidad de proteína del lisado, se observa que la infección con HSV-1 produce un aumento significativo de los niveles de A β 40 y A β 42 a ambos tiempos (18h: A β 40, $p=0.002$; A β 42, $p=0.0009$; 48h: A β 42, $p=0.003$; A β 42, $p=0.001$) (Figura 35A). En paralelo a los ensayos de ELISA de A β , se analizaron los niveles de APP en los lisados celulares mediante WB para determinar el efecto de la infección con HSV-1 sobre los niveles de APP. Se empleó el anticuerpo 22C11 que reconoce un epítipo en el extremo N-terminal del APP. El experimento mostró una disminución de la inmunorreactividad del anticuerpo en células infectadas con HSV-1 en los tiempos analizados (aproximadamente dos veces), indicando que el aumento de los niveles de A β intracelular no es debido a un aumento de la expresión de APP como consecuencia de la infección (Figura 35B).

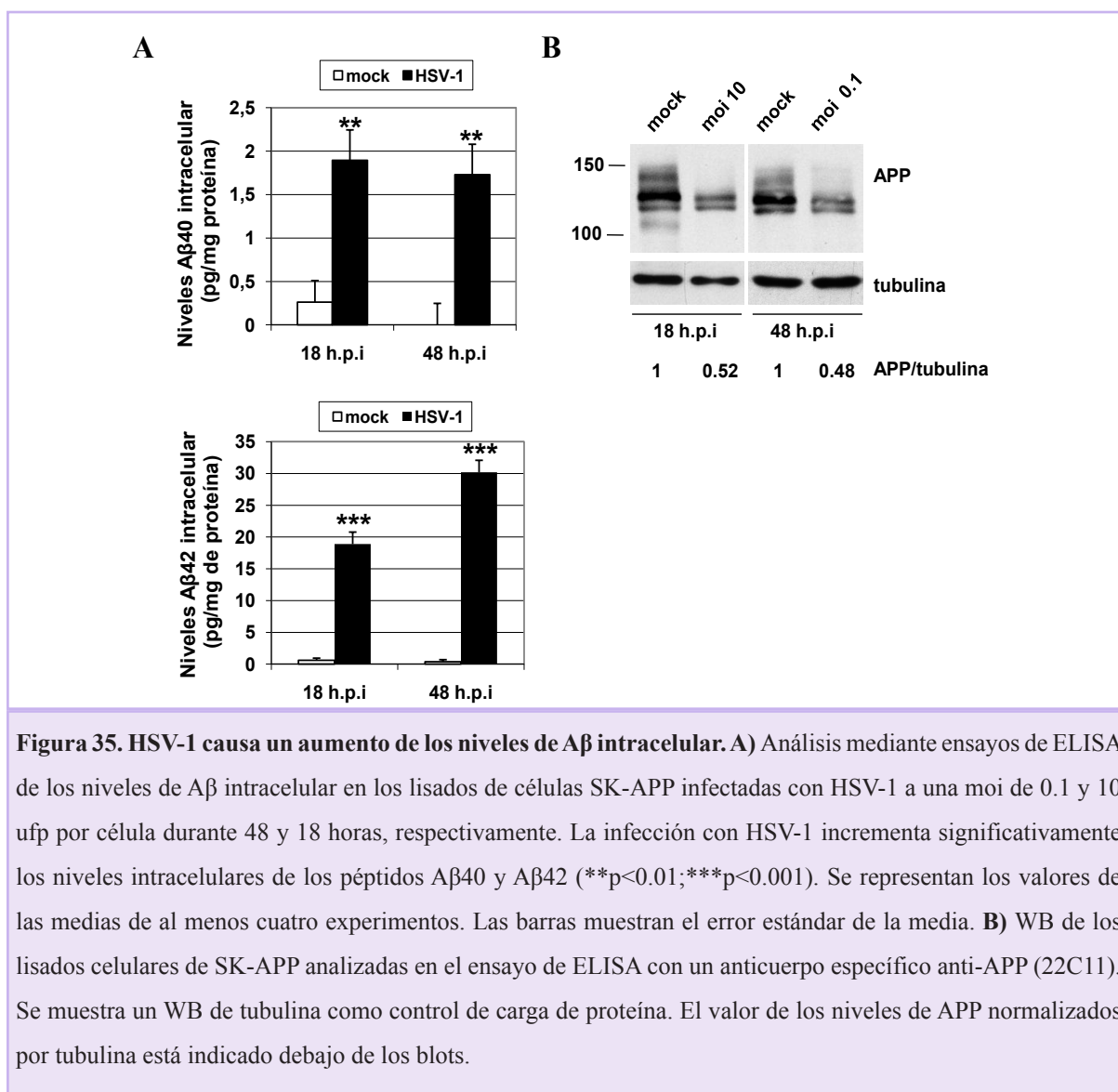
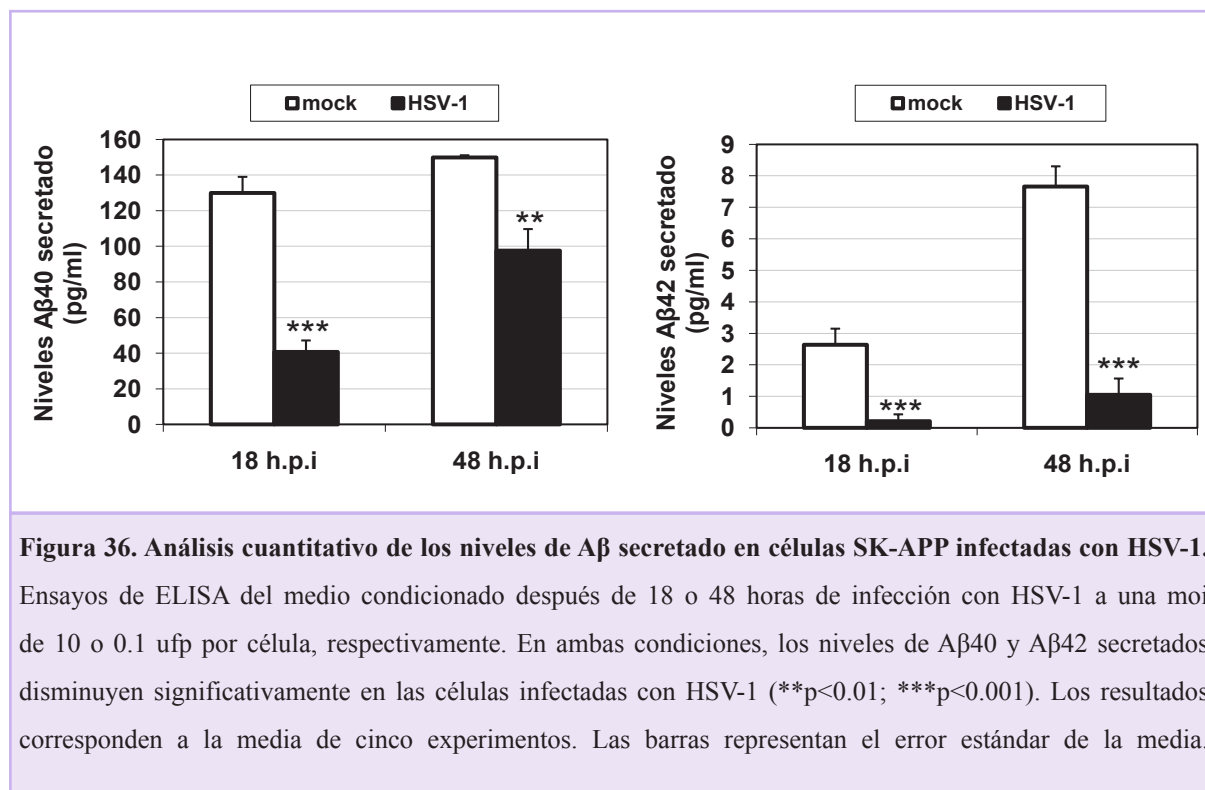


Figura 35. HSV-1 causa un aumento de los niveles de Aβ intracelular. **A)** Análisis mediante ensayos de ELISA de los niveles de Aβ intracelular en los lisados de células SK-APP infectadas con HSV-1 a una moi de 0.1 y 10 ufp por célula durante 48 y 18 horas, respectivamente. La infección con HSV-1 incrementa significativamente los niveles intracelulares de los péptidos Aβ40 y Aβ42 (**p<0.01;***p<0.001). Se representan los valores de las medias de al menos cuatro experimentos. Las barras muestran el error estándar de la media. **B)** WB de los lisados celulares de SK-APP analizadas en el ensayo de ELISA con un anticuerpo específico anti-APP (22C11). Se muestra un WB de tubulina como control de carga de proteína. El valor de los niveles de APP normalizados por tubulina está indicado debajo de los blots.

5.2.2. HSV-1 INDUCE UNA DISMINUCIÓN DE LOS NIVELES DEL PÉPTIDO Aβ SECRETADO.

Como la infección con HSV-1 induce la acumulación de Aβ intracelular, se analizó si la secreción del péptido Aβ estaba afectada en las células SK-APP infectadas. Para ello, se analizaron los niveles de péptido Aβ secretado en el medio condicionado de células infectadas con HSV-1 durante 18 horas mediante ensayos de ELISA. Los resultados evidenciaron una disminución acusada, superior a tres veces, en los niveles de Aβ40 y Aβ42 secretados (Aβ40, $p=1.1 \times 10^{-7}$; Aβ42, $p=3.8 \times 10^{-4}$). Posteriormente, se monitorizaron los niveles de Aβ secretado en células SK-APP infectadas con una moi menor (moi 0.1 ufp por célula durante 48 horas), un escenario más similar a la infección natural de HSV-1,

registrándose una reducción significativa muy elevada de los niveles de A β secretado, superior a 7 veces en el caso de A β 42 (A β 40, $p=0.007$; A β 42 $p=2.2\times 10^{-5}$) (Figura 36).



Se ha descrito que el péptido A β es secretado mayoritariamente a través de la ruta secretora constitutiva. Con el fin de confirmar si esta ruta está afectada en células infectadas con HSV-1, se llevó a cabo un ensayo luminiscente de secreción basado en la medida de la actividad de la luciferasa de *Gaussia* (GLuc) secretada al medio en células infectadas con HSV-1 (ver apartado 4.15 de Materiales y Métodos). En las células SK-APP transfectadas con GLuc, el tratamiento con brefeldina A, un inhibidor de la secreción, indujo una fuerte inhibición de la secreción de GLuc. Sin embargo, la infección con HSV-1 indujo un incremento muy elevado de la secreción de GLuc en el medio condicionado de una manera dependiente de tiempo y de dosis viral (Figura 37A). De igual modo, para eliminar los posibles efectos de la sobreexpresión de APP, se realizó el mismo experimento en las células SK-N-MC obteniéndose resultados similares (Figura 37B). Así, HSV-1 induce un aumento de la actividad de la vía secretora constitutiva, indicando que la secreción de A β tiene lugar a través de otra ruta de secreción alternativa.

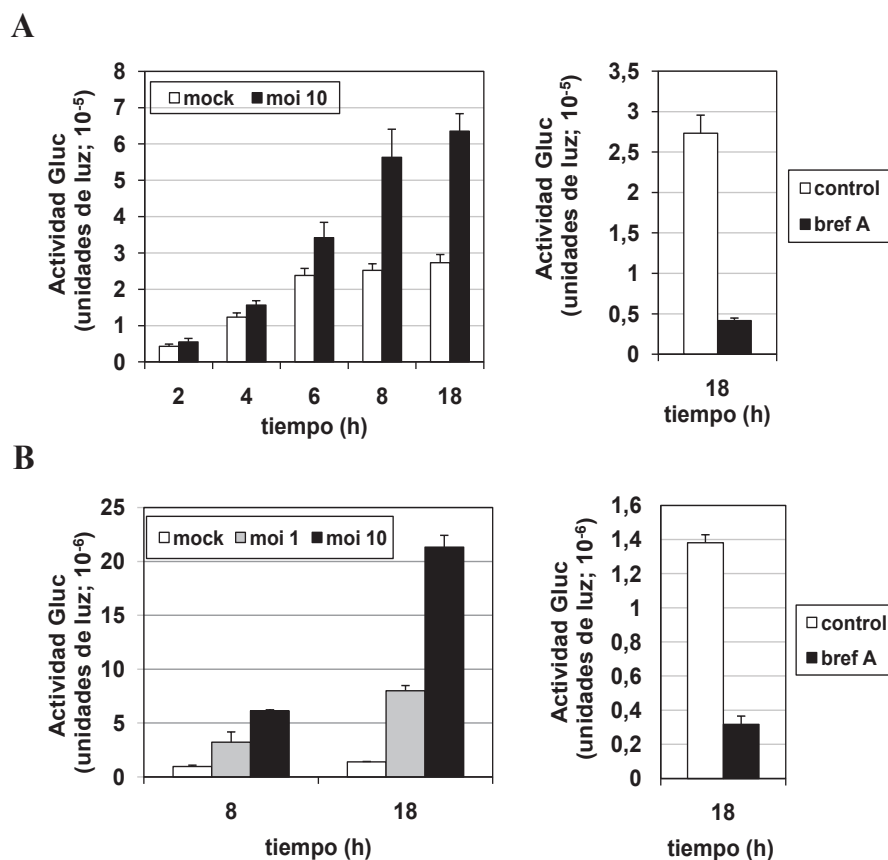
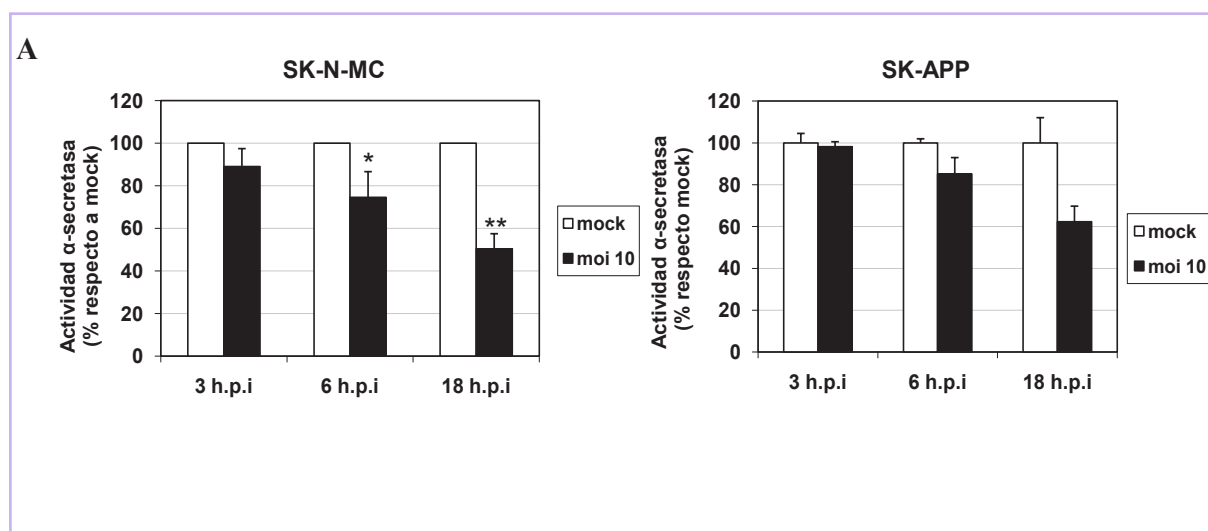


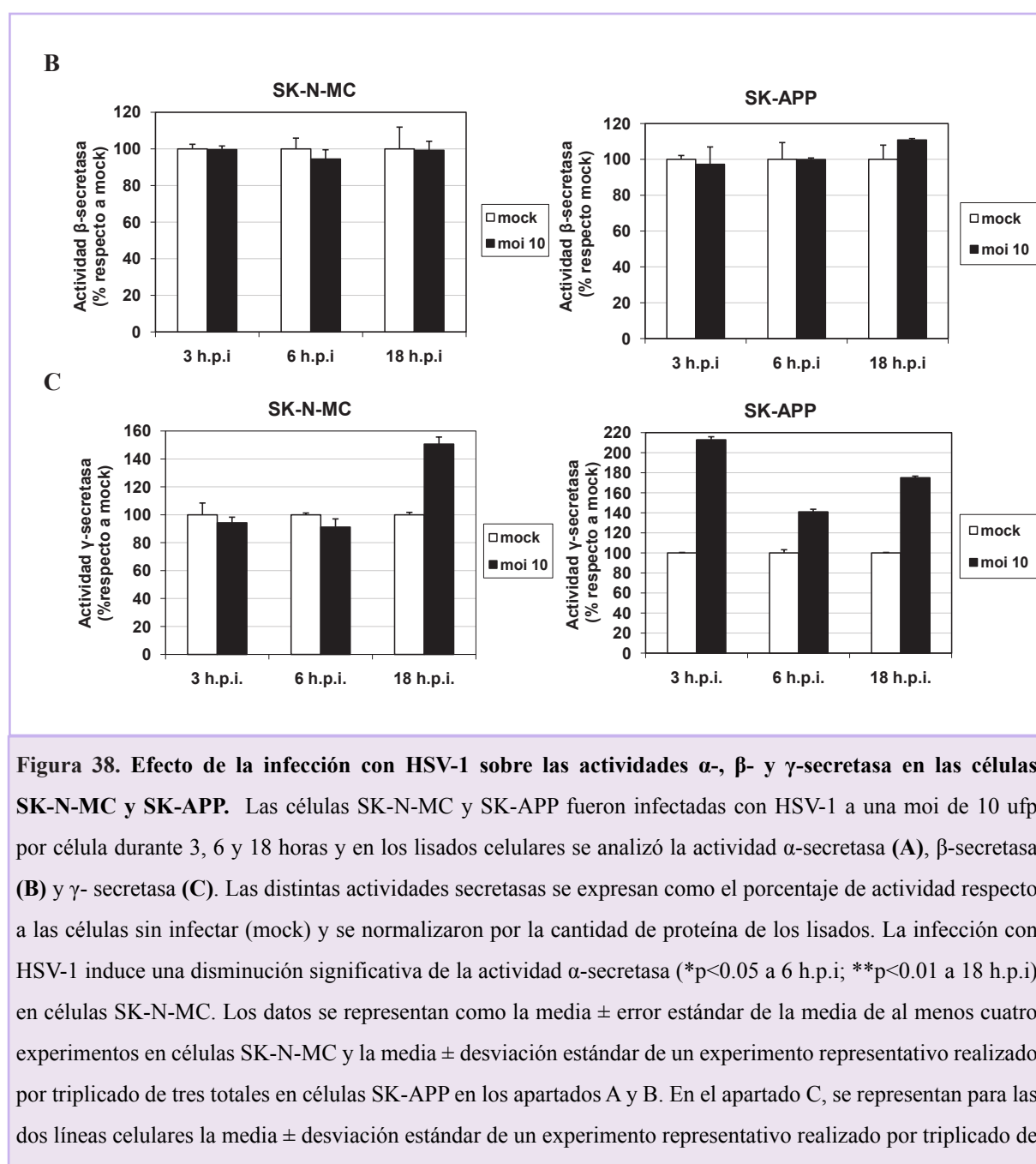
Figura 37. La infección con HSV-1 incrementa la secreción de GLuc. Las células SK-APP (A) y SK-N-MC (B) fueron transfectadas con el plásmido control pCMV-Gluc, que codifica para la luciferasa *Gaussia luciferase* (GLuc) secretada. Transcurridas 24 horas, se infectaron con HSV-1 a las moi y tiempos indicados en cada gráfica. Como control del ensayo se muestra el efecto de la brefeldina A (bref A) sobre la actividad de GLuc. La actividad de GLuc se representa en unidades relativas de luz. Los datos se representan como la media \pm desviación estándar de un experimento realizado por triplicado de tres totales.

5.2.3. HSV-1 CAUSA UNA DISMINUCIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA VÍA DE PROCESAMIENTO NO AMILOIDOGENICA DE APP.

5.2.3.1. La infección con HSV-1 reduce la actividad α -secretasa.

Con el objetivo de investigar si los niveles alterados del péptido A β inducidos por la infección con HSV-1 eran debidos a la modificación de la actividad de las diferentes secretasas implicadas en el procesamiento de APP, analizamos el efecto de la infección en las actividades α -, β - y γ -secretasas mediante ensayos fluorimétricos específicos de las distintas actividades. Como se muestra en la figura 38A, la actividad α -secretasa en células SK-N-MC infectadas con HSV-1 disminuye significativamente respecto a las células control sin infectar (6 h.p.i, $p<0.05$; 18 h.p.i, $p<0.001$), siendo esta disminución detectable a partir de 3 h.p.i. Se obtuvieron resultados similares en las células SK-APP. Por el contrario, la infección con HSV-1 no tiene efecto sobre la actividad β -secretasa en las células SK-N-MC y SK-APP (Figura 38B) y produce un aumento de la actividad γ -secretasa en las células SK-N-MC a tiempos tardíos y en las células SK-APP desde las 3 h.p.i, aunque no es significativo ya que los niveles de actividad encontrados están próximos al límite de detección del ensayo fluorimétrico (Figura 38C). La activación de la γ -secretasa inducida por la infección con HSV-1 podría ser responsable, al menos en parte, de la acumulación de A β intracelular observada en las células infectadas

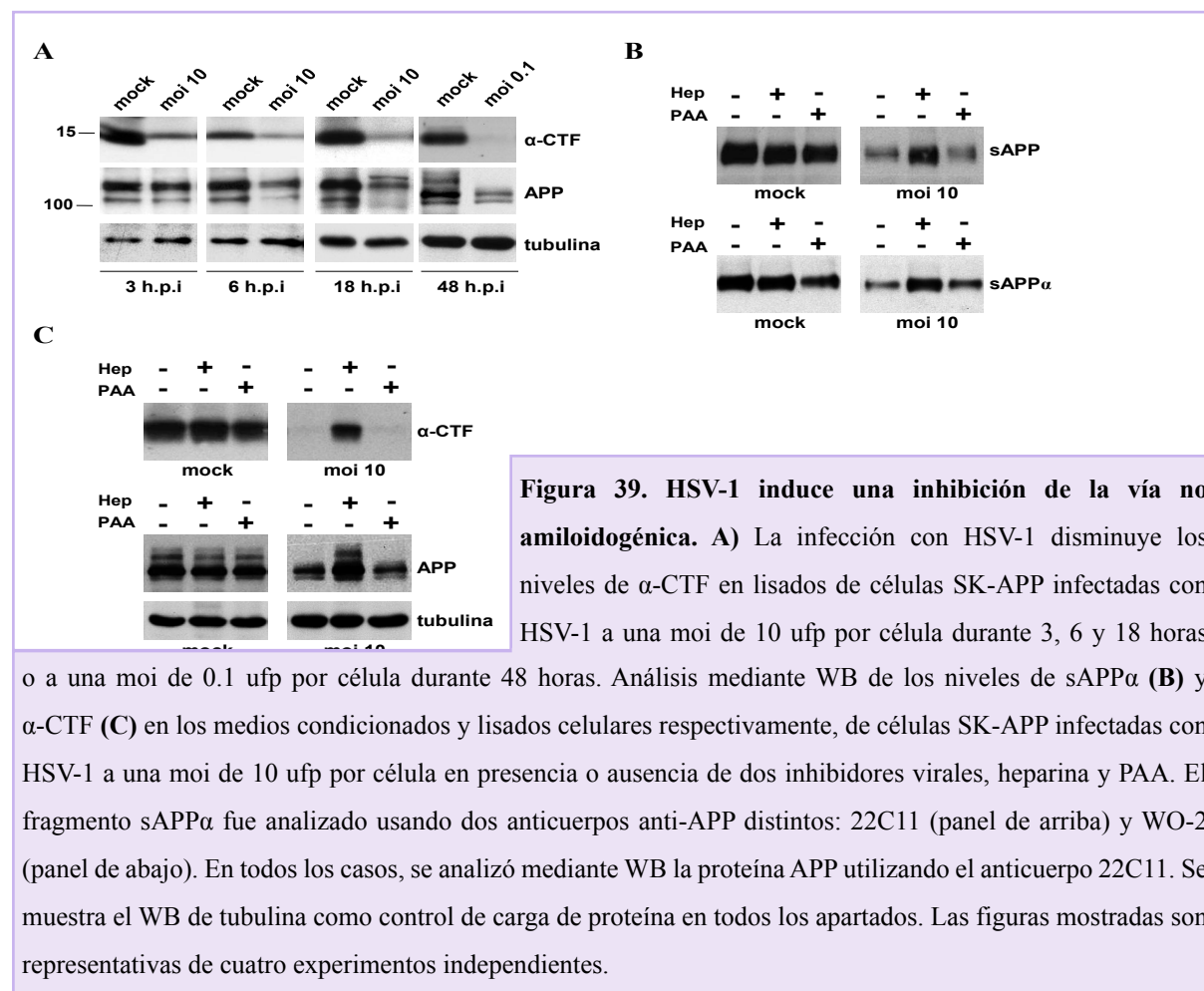




5.2.3.2. La infección con HSV-1 disminuye los niveles de los fragmentos proteolíticos sAPP α y α -CTF del APP.

Posteriormente, se examinó el efecto de la infección con HSV-1 en la generación de los productos resultantes de la actividad α -secretasa: α -CTF y sAPP α . Cuando se determinaron los niveles de α -CTF en los lisados celulares, se observó que la infección con HSV-1 disminuye

fuertemente la formación del fragmento α -CTF a 3, 6 y 18 h.p.i, siendo esta disminución más acusada a 18 h.p.i cuando la inhibición de la actividad α -secretasa es más intensa. También se confirma la disminución de los niveles de α -CTF en condiciones de infección más cercanas a la infección fisiológica (moi 0.1 ufp por célula durante 48 horas) (Figura 39A). Del mismo modo, cuando se analiza el medio extracelular de células SK-APP infectadas con HSV-1, se observa que la infección provoca una disminución muy acusada de los niveles de APP secretado. Utilizando un anticuerpo que reconoce específicamente sAPP α y no otras especies de APP soluble (WO-2), se confirmó la disminución de sAPP α (Figura 39B). El tratamiento con heparina revertiría completamente la disminución de los niveles de sAPP α y α -CTF, indicando que este efecto es provocado específicamente por la infección con HSV-1. Por otra parte, no es necesaria una infección productiva para inducir la disminución de los niveles de los productos del procesamiento de α -secretasa, ya que el tratamiento con PAA no tuvo ningún efecto sobre los niveles de α -CTF y sAPP α (Figuras 39B y 39C). Estos datos son consistentes con la inhibición de la actividad α -secretasa inducida por HSV-1 e indican que el virus causa una disminución de la actividad de la ruta de procesamiento no amiloidogénico de APP.



Para comprobar que los resultados obtenidos en las células SK-APP no son debidos a la disminución de la expresión de APP inducida por la infección con HSV-1, realizamos una serie de experimentos en otra de las líneas celulares que expresa establemente APP humano generada en nuestro laboratorio y a la que nos referiremos como SK-APP-C3 (Carballal, 2003). Esta línea celular expresa niveles menores de APP (Figura 40A), pero al contrario que en la línea SK-APP, se produce un aumento de la expresión de APP como consecuencia de la infección con HSV-1 (Figura 40B). En concordancia con los resultados obtenidos en la línea SK-APP, la infección con HSV-1 de células SK-APP-C3 induce la acumulación del péptido A β intracelular, tanto de la forma de 40 como de la de 42 aminoácidos, como demuestran los ensayos de inmunofluorescencia (Figura 41A). Además, se cuantificó el péptido A β intracelular y secretado mediante ensayos de ELISA en células infectadas con HSV-1 a 18 y 48 horas, detectándose un acusado incremento del péptido A β 42 intracelular y una gran disminución de la secreción del péptido A β 40 en las células infectadas con HSV-1 a ambos tiempos (Figura 41B). Los péptidos A β 40 intracelular y A β 42 secretado no son detectables en los ensayos de ELISA probablemente debido a los niveles más bajos de expresión de APP en las células SK-APP-C3.

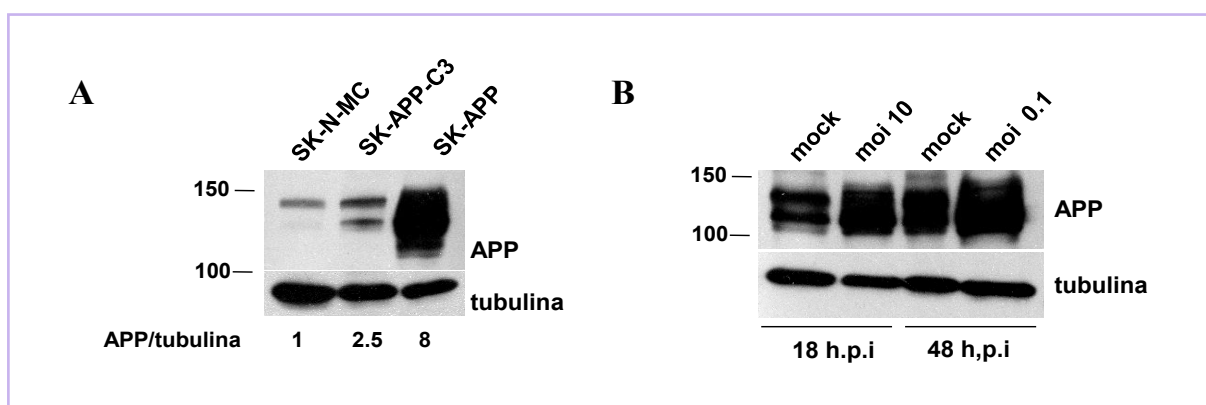
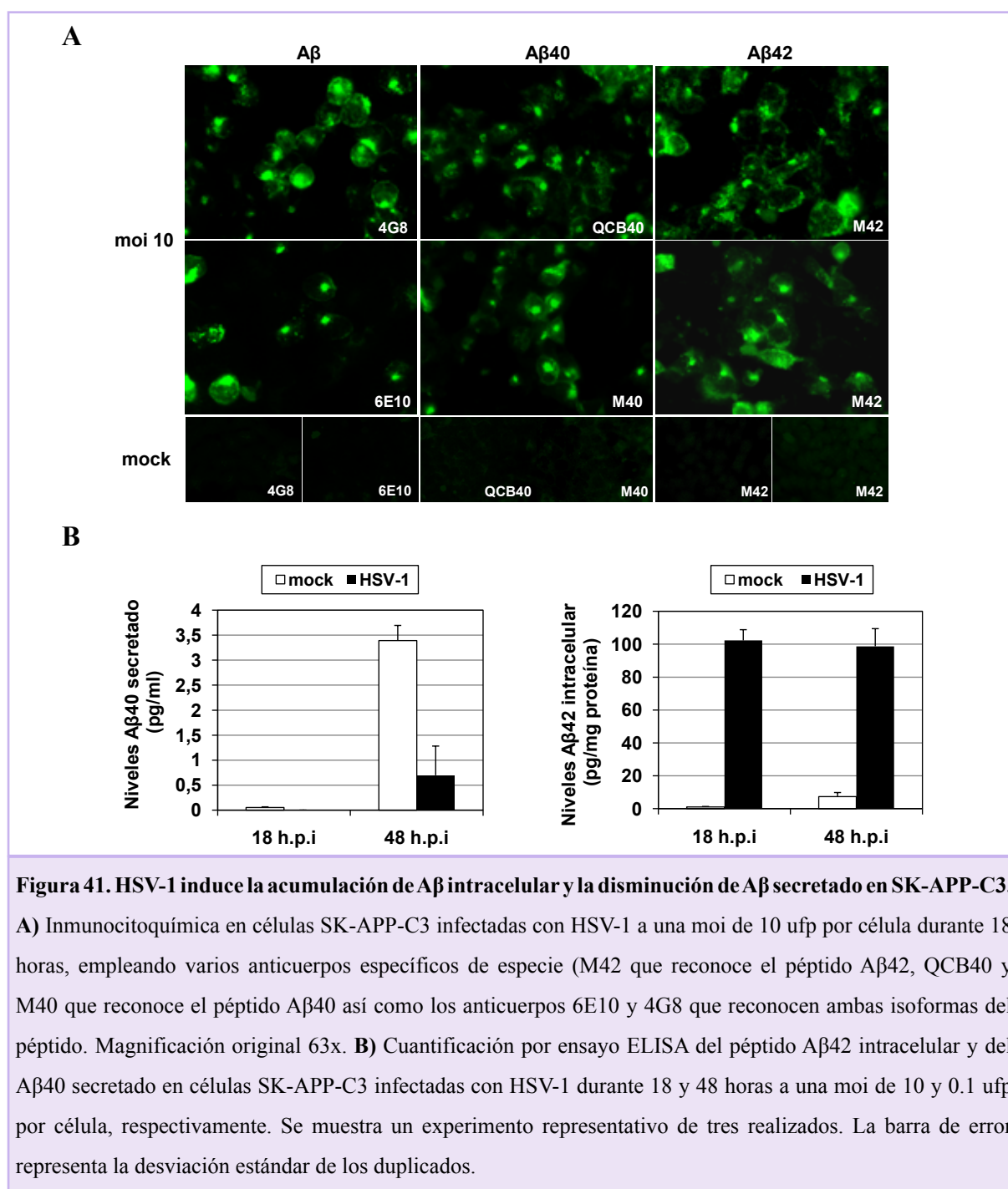


Figura 40. La infección con HSV-1 aumenta la expresión de APP en SK-APP-C3. A) Análisis mediante WB empleando el anticuerpo 22C11 que reconoce la proteína APP en lisados celulares de SK-N-MC, SK-APP y SK-APP-C3. B) Las células SK-APP-C3 fueron infectadas con HSV-1 a una moi de 0.1 y 10 ufp por célula durante 48 y 18 horas, respectivamente, y se analizaron mediante WB con el anticuerpo 22C11. La infección con HSV-1 produce un aumento de la expresión de APP. En ambos casos, se muestra el WB de tubulina como control de carga de proteína.



De esta forma, los resultados obtenidos en las líneas celulares SK-APP y SK-APP-C3 sugieren que la alteración diferencial de los niveles del péptido Aβ intracelular y secretado causado por la infección con HSV-1 es independiente de los niveles intracelulares de APP.

5.3. IMPLICACIÓN DEL PROCESO AUTOFÁGICO EN LA ACUMULACIÓN DEL PÉPTIDO A β INDUCIDA POR HSV-1.

5.3.1. ESTUDIO DE LA ACUMULACIÓN DE AUTOFAGOSOMAS INDUCIDA POR LA INFECCIÓN CON HSV-1 EN LAS CÉLULAS SK-APP.

5.3.1.1. HSV-1 induce la acumulación de vesículas autofágicas en las células SK-APP.

Los resultados descritos en los apartados 5.1 y 5.2 demuestran que HSV-1 induce la acumulación de vesículas autofágicas y del péptido A β de una forma dependiente de tiempo y de dosis viral. Además, en células infectadas, el marcador de autofagia LC3 presenta un patrón de distribución similar al mostrado por el péptido A β intracelular acumulado en las células como consecuencia de la infección. Estos datos sugieren una posible conexión funcional entre el incremento de vesículas autofágicas y la acumulación del péptido A β en las células infectadas con HSV-1.

Investigando esta hipótesis, se analizó en primer lugar si la acumulación de vesículas autofágicas también tenía lugar en células SK-APP infectadas. Para ello, las células SK-APP transfectadas transitoriamente con el plásmido de expresión de GFP-LC3 fueron infectadas con HSV-1 durante 18 horas, y analizadas mediante WB y microscopía de fluorescencia. El WB reveló que, mientras la banda GFP-LC3-II no se detecta en células sin infectar, la infección con HSV-1 provoca la aparición de GFP-LC3-II indicando la acumulación de vesículas autofágicas (Figura 42A). La observación de GFP-LC3 mediante microscopía de fluorescencia corrobora los datos obtenidos mediante WB, ya que la infección con HSV-1 produce un patrón de marcaje punteado de GFP-LC3, característico de vesículas autofágicas, claramente diferenciable del patrón citosólico de las células sin infectar (figura 42B).

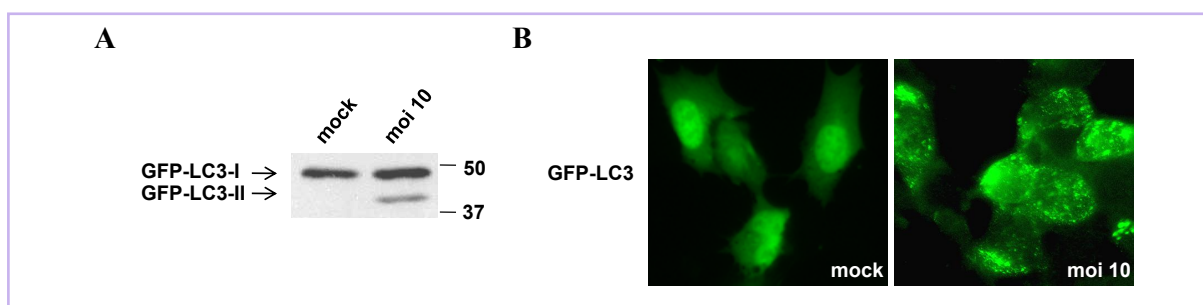


Figura 42. Acumulación de vesículas autofágicas inducida por la infección con HSV-1 en células SK-APP.

A) Análisis mediante WB de los niveles de GFP-LC3 en células SK-APP transfectadas con GFP-LC3 y posteriormente infectadas con HSV-1 a una moi de 10 ufp por célula durante 18 horas. Se utilizó un anticuerpo anti-GFP. **B)** Análisis del patrón de distribución de la proteína GFP-LC3 mediante microscopía de fluorescencia en células infectadas en las mismas condiciones que en el apartado A. Magnificación original 63x.

Evidencias recientes han demostrado que la proteína de fusión GFP-LC3 puede acumularse en cuerpos de inclusión que muestran un marcaje similar al patrón de distribución de las vesículas autofágicas (Kuma y cols., 2007). Por lo tanto, se analizó la lipidación y la distribución de la proteína LC3 endógena mediante WB e inmunofluorescencia. En consonancia con los resultados obtenidos en las células SK-LC3, la infección con HSV-1 induce la acumulación de vesículas autofágicas en las células SK-APP como se desprende del patrón punteado de la fluorescencia (Figura 43A). Además, la inmunorreactividad de LC3 aparece en células infectadas identificadas con un anticuerpo que reconoce la glicoproteína gC viral. En los ensayos de WB, se observa que la acumulación de vesículas autofágicas está asociada con un aumento de la inmunorreactividad de LC3-II y una disminución de la inmunorreactividad de LC3-I en las células infectadas con HSV-1, respecto a las células sin infectar (Figura 43B).

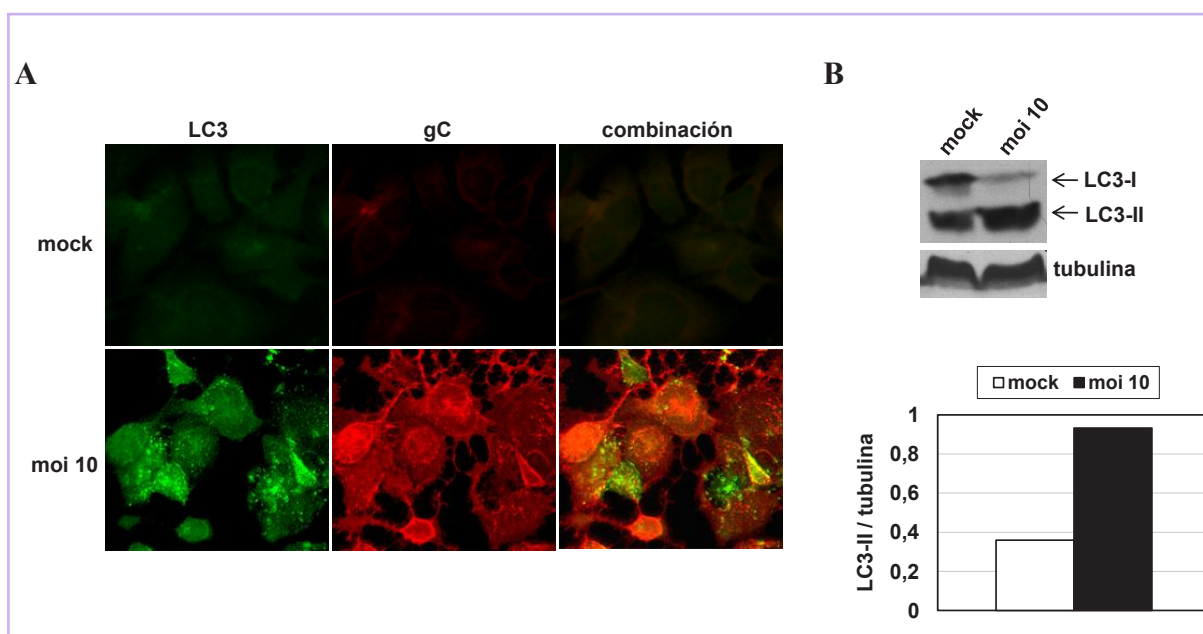


Figura 43. La infección con HSV-1 induce la acumulación de vesículas autofágicas en las células SK-APP.

Las células SK-APP fueron infectadas con HSV-1 a una moi de 10 ufp por célula durante 18 horas. **A)** Ensayo de inmunofluorescencia doble usando los anticuerpos anti-LC3 y anti-gC. La infección con HSV-1 induce una acumulación de vesículas autofágicas en las células infectadas. Magnificación original 63x. **B)** Ensayo de WB representativo de cuatro realizados donde se muestra el incremento de los niveles de LC3-II endógeno en las células infectadas. El WB de tubulina se muestra como control de carga de proteína. La gráfica representa los niveles de LC3-II normalizados por tubulina a partir de los datos densitométricos.

5.3.1.2. El péptido A β se localiza en vesículas autofágicas en células SK-APP transfectadas con GFP-LC3.

Una vez comprobado que la infección con HSV-1 induce la acumulación de vesículas autofágicas y del péptido A β intracelular en las células SK-APP, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia con el fin de analizar si el péptido A β se localizaba en vesículas autofágicas. Para ello, las células SK-APP, transfectadas con el plásmido GFP-LC3, fueron infectadas con HSV-1. Como se muestra en la figura 44, GFP-LC3 presenta un patrón de distribución concentrado, correspondiente con la acumulación de vesículas autofágicas, que coincide con el patrón de marcaje de los péptidos A β 40 y A β 42 detectados con anticuerpos específicos, como indica el marcaje amarillo en la figura combinada. Estos resultados sugieren que el péptido A β que se acumula tras la infección con HSV-1 está localizado en la misma estructura subcelular que GFP-LC3.

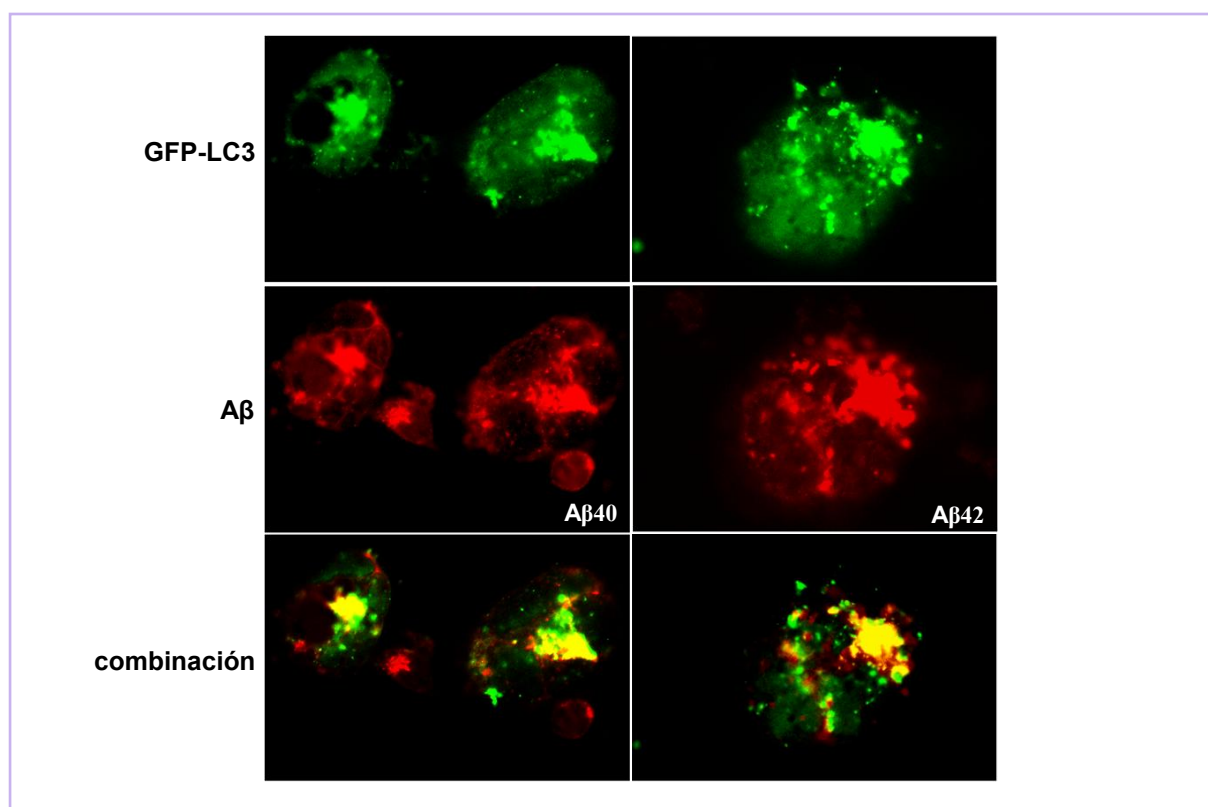


Figura 44. Colocalización de GFP-LC3 con el péptido A β en células SK-APP infectadas con HSV-1.

Inmunocitoquímica de células SK-APP transfectadas con el plásmido GFP-LC3 e infectadas con HSV-1 a una moi de 10 ufp por célula durante 18 horas, utilizando anticuerpos específicos contra los péptidos A β 40 y A β 42. HSV-1 induce la aparición de A β 40 y A β 42 con un patrón similar al marcaje de GFP-LC3. La combinación de ambos marcajes revela una colocalización de GFP-LC3-II tanto con el péptido A β 40 como con el péptido A β 42. Magnificación original 63x.

5.3.1.3. El péptido A β colocaliza con LC3 endógeno en las células SK-APP.

Posteriormente, se analizó la distribución de la proteína LC3 endógena y del péptido A β mediante microscopía confocal en células SK-APP infectadas con HSV-1 durante 18 horas (Figura 45). Las imágenes de confocal mostraban que las estructuras inmunoreactivas de A β 40 y A β 42 colocalizaban con las vesículas LC3 positivas en células SK-APP infectadas con HSV-1, apareciendo un marcaje amarillo en la imagen combinada (Figura 45A). Por el contrario, el marcaje de LC3 y A β es indetectable en las células sin infectar. Además, también se observa la colocalización del péptido A β y LC3 en las células infectadas con HSV-1 a una moi más baja y durante más tiempo, condiciones que se asemejan más a una situación fisiológica (Figura 45B). Todos estos resultados sugieren que el péptido A β se acumula en las vesículas autofágicas de las células infectadas con HSV-1.

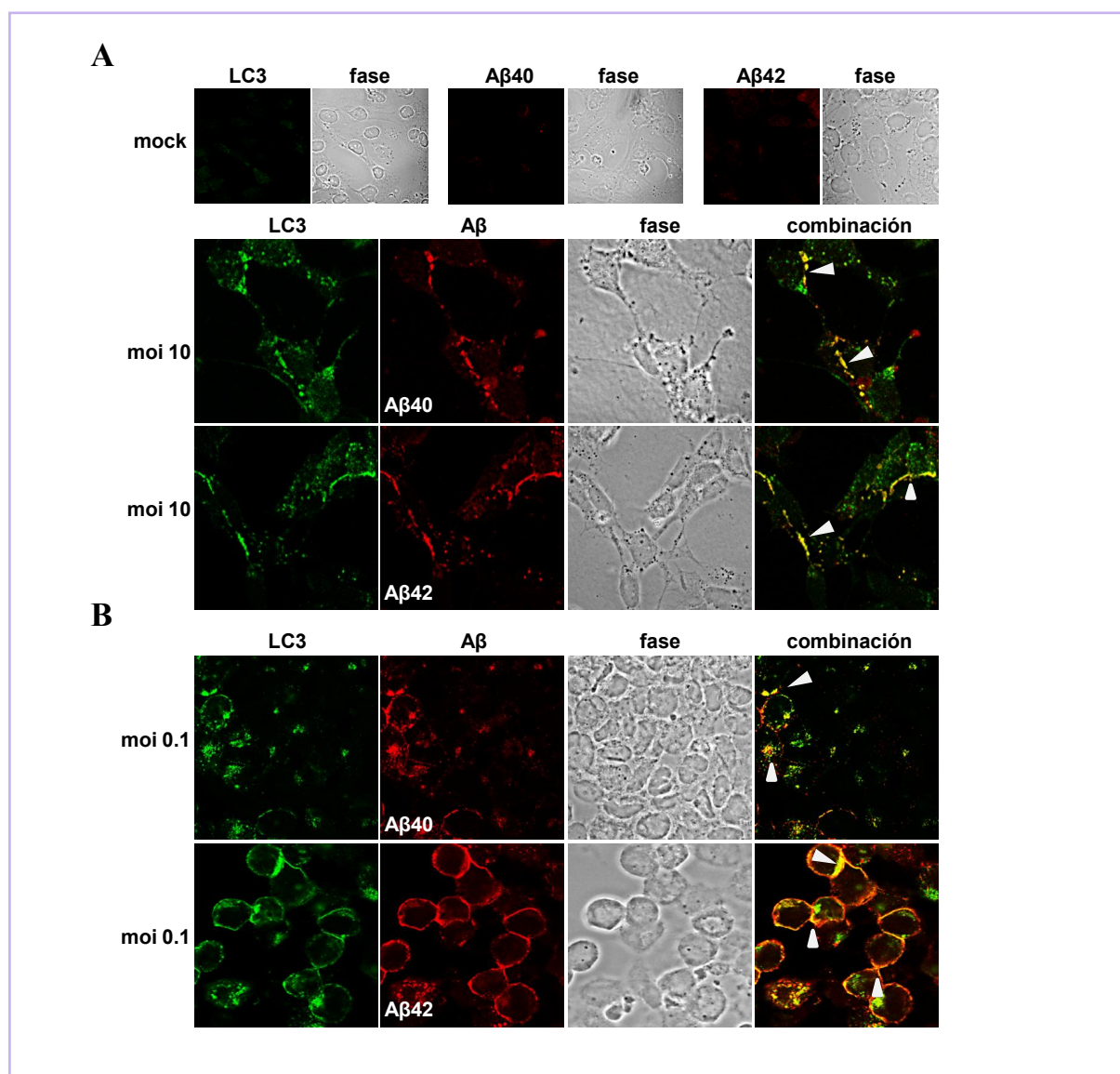


Figura 45. El péptido A β colocaliza con la proteína LC3 endógena en las células SK-APP infectadas con HSV-1. Las células SK-APP se infectaron con HSV-1 a una moi de 10 y 0.1 ufp por célula durante 18 **(A)** y 48 **(B)** horas, respectivamente. Se analizó mediante microscopía confocal la distribución de la proteína LC3 endógena y del péptido A β con anticuerpos específicos. También se muestran las imágenes de contraste de fase. Las imágenes muestran que la infección con HSV-1 induce la colocalización de la proteína LC3 endógena y ambas isoformas de A β , tanto a 18 horas **(A)** como a 48 horas **(B)**. El marcaje de LC3 y A β son indetectables en las células sin infectar (mock). Magnificación original 63x.

5.3.1.4. La acumulación de vesículas autofágicas y del péptido A β intracelular es específica de la infección por HSV-1.

Para determinar si la modificación tanto del péptido A β como de la proteína LC3 era debida específicamente a la infección con HSV-1, se llevaron a cabo experimentos de infección con el virus Sindbis, un alfavirus con alto tropismo neuronal. Así, las células SK-APP fueron infectadas con un virus Sindbis que expresa GFP como marcador (SV-GFP). SV-GFP es un virus neurotrópico que presenta una replicación deficiente y una toxicidad baja. Como se observa en la figura 46A, la infección con SV-GFP no induce la acumulación de vesículas autofágicas ni un incremento intracelular de los péptidos A β 40 y A β 42, como revela la ausencia de marcaje tanto de LC3 como del péptido A β en los distintos tiempos de infección. En paralelo, se llevó a cabo un ensayo de microscopía confocal en células SK-APP-C3 infectadas con SV-GFP y se obtuvieron los mismos resultados (Figura 46B).

A continuación, con el fin de corroborar los resultados obtenidos mediante ensayos de inmunofluorescencia, se evaluaron los niveles de A β en los sobrenadantes de SK-APP infectadas con SV-GFP a 18 y 48 horas mediante ensayos de ELISA, utilizando anticuerpos específicos de las especies A β 40 y A β 42. Como se muestra en la figura 47, la infección con SV no altera significativamente los niveles de ninguna de las dos isoformas de A β en comparación con las células sin infectar.

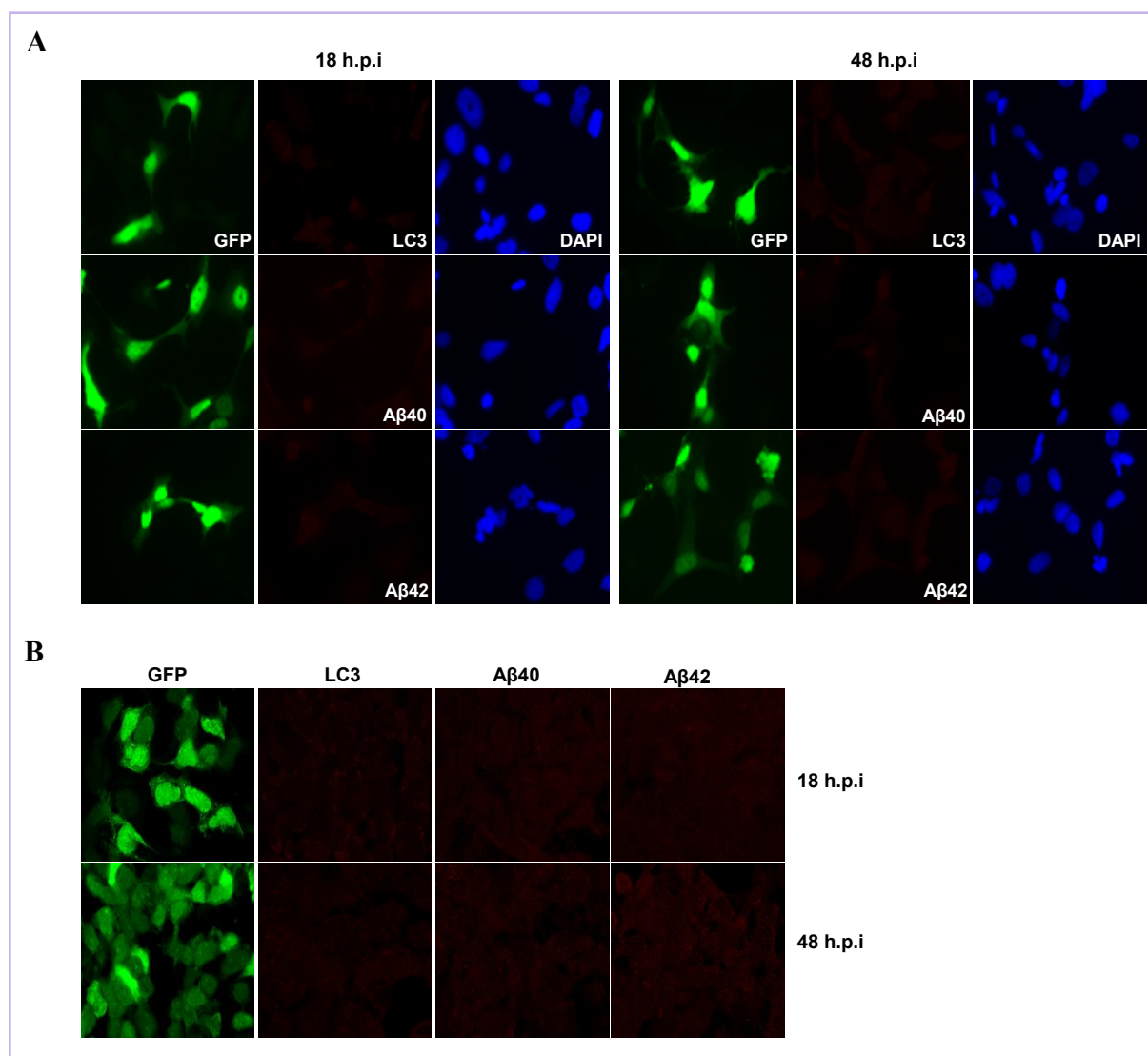


Figura 46. La infección con virus Sindbis no induce la acumulación de vesículas autofágicas ni del péptido Aβ en las células SK-APP. Ensayos de microscopía de fluorescencia de células SK-APP (**A**) y microscopía confocal de células SK-APP-C3 (**B**) infectadas con SV-GFP durante 18 y 48 horas. El marcaje con GFP muestra las células infectadas con Sindbis virus. Se utilizaron anticuerpos que reconocen específicamente la proteína LC3 y los péptidos Aβ40 y Aβ42. La infección con SV-GFP no induce la acumulación de LC3 ni incrementa el péptido Aβ intracelular. En el panel **A**, se muestra la tinción de los núcleos con DAPI. Magnificación original 63x.

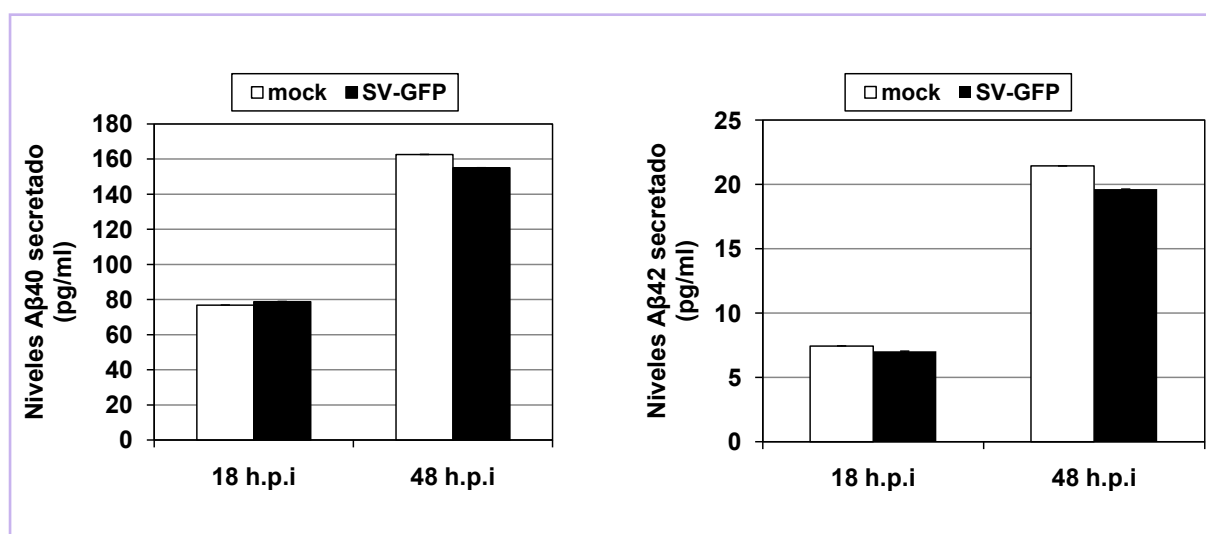
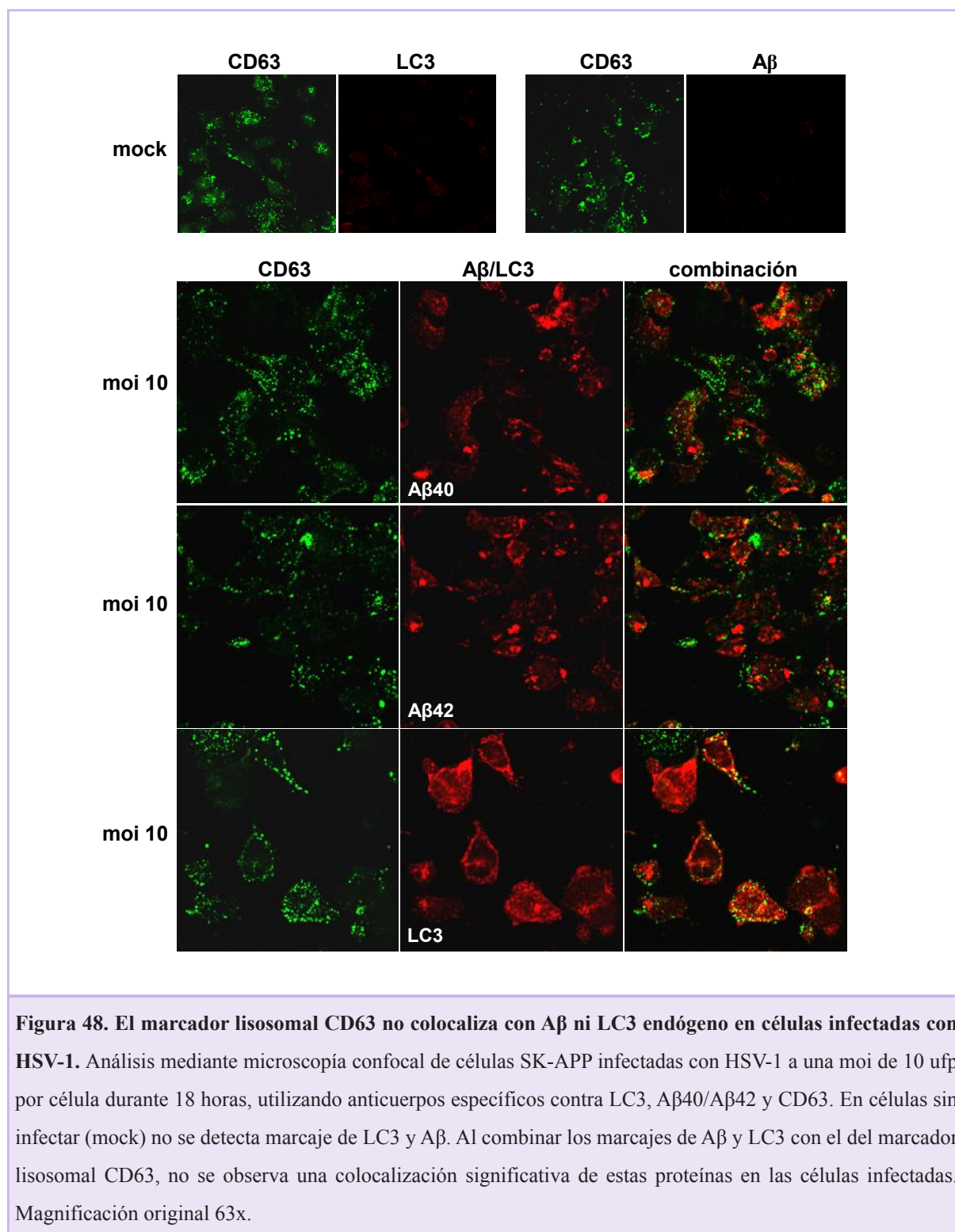


Figura 47. La infección con SV-GFP no modifica los niveles del péptido Aβ secretado en las células SK-APP. Análisis mediante ensayos de ELISA de los medios condicionados de células SK-APP infectadas con SV-GFP durante 18 y 48 horas. La infección con SV-GFP no modifica significativamente los niveles de los péptidos Aβ40 y Aβ42 secretados. Se muestra un experimento representativo realizado por duplicado. La barra de error representa la desviación estándar de la media de los duplicados.

5.3.2. EL PÉPTIDO Aβ Y LA PROTEÍNA LC3 NO SE LOCALIZAN EN EL COMPARTIMENTO LISOSOMAL DE CÉLULAS SK-APP INFECTADAS CON HSV-1.

Una vez demostrado que el péptido Aβ colocaliza con la proteína LC3 y considerando que el lisosoma es el orgánulo de destino de la vía autofágica, se llevó a cabo un estudio para determinar si el péptido Aβ y la proteína LC3 endógena se localizan en este compartimento celular. Para ello, se analizó en células SK-APP infectadas con HSV-1 el marcaje del péptido Aβ, la proteína LC3 y el marcador lisosomal CD63 mediante microscopía confocal. En las células sin infectar, se observa el patrón característico de distribución citosólica de los lisosomas, mientras que no se detecta LC3 ni Aβ. En las células infectadas, aparece un fuerte marcaje de Aβ y LC3 endógeno, pero se observa una escasa colocalización de CD63 con las dos proteínas (Figura 48). Estos resultados indican que LC3 endógeno y el péptido Aβ no se acumulan en los lisosomas.



5.3.3. EL PÉPTIDO A β COLOCALIZA CON MARCADORES DE ENDOSOMAS TARDÍOS.

En el apartado 5.1.4.3 de Resultados, se describe la convergencia de la vía autofágica y endosomal mediante el estudio de la distribución del marcador LC3 y dos proteínas endosomales en las células SK-N-MC infectadas con HSV-1. Debido a que en experimentos anteriores se ha demostrado la colocación del péptido A β y la proteína LC3, a continuación también se analizó el patrón de distribución del péptido A β y los marcadores endosomales EEA1 y CD222 en las células SK-APP. Para ello, las células SK-APP fueron infectadas con HSV-1 y analizadas mediante microscopía de confocal utilizando anticuerpos específicos de A β 40 y A β 42. Como se observa en la figura 49, en las células control el marcaje de A β es indetectable. Por el contrario, el marcador endosomal temprano EEA1 presenta un patrón de fluorescencia punteado en el citoplasma. La infección con HSV-1 aumenta la inmunorreactividad de A β 40 y A β 42, sin alterar significativamente el patrón de distribución de EEA1. En concordancia con los resultados obtenidos para el marcador autofágico LC3, la combinación de ambos marcajes revela que las vesículas autofágicas que acumulan A β no contienen marcadores de endosomas tempranos.

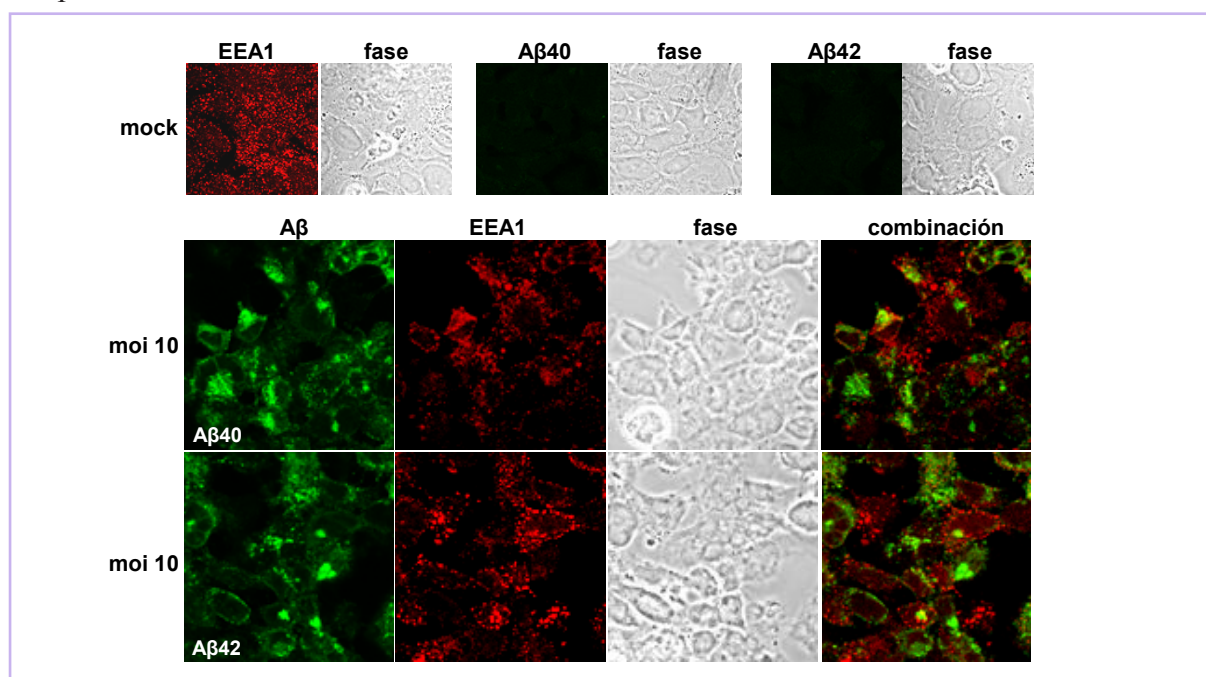


Figura 49. El péptido A β no colocaliza con marcadores endosomales tempranos en las células SK-APP infectadas con HSV-1. Las células SK-APP fueron infectadas con HSV-1 a una moi de 10 ufp por célula durante 18 horas y se analizaron por microscopía confocal empleando anticuerpos anti-EEA1 y anti-A β . Se muestran las imágenes en contraste de fase. Las figuras combinadas muestran el marcaje de A β 40 y A β 42 y EEA1. Magnificación original 63x.

En paralelo, también se analizó el patrón de distribución del marcador endosomal tardío CD222 en las células SK-APP (Figura 50). Las imágenes de microscopía confocal muestran que, del mismo modo que la proteína LC3, el péptido A β colocaliza con la proteína CD222 en las células SK-APP infectadas con HSV-1, indicando que el péptido A β se acumula en compartimentos autofágicos que contienen marcadores de endosomas tardíos pero no marcadores de endosomas tempranos o lisosomales.

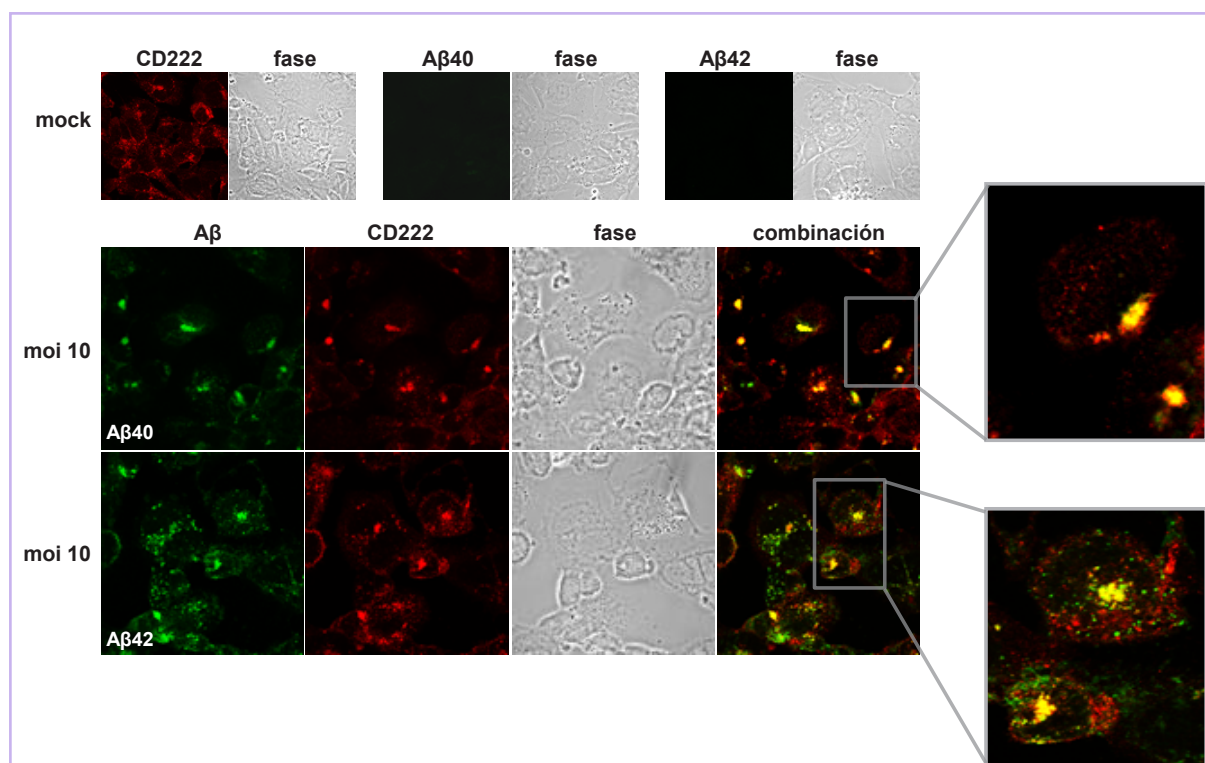


Figura 50. Colocalización del péptido A β con el marcador de endosomas tardíos CD222 en las células SK-APP infectadas con HSV-1. Análisis mediante microscopía confocal de células SK-APP infectadas con HSV-1 a una moi de 10 ufp por célula durante 18 horas utilizando anticuerpos que reconocen específicamente la proteína CD222 y los péptidos A β 40 y A β 42. También se muestran las imágenes de contraste de fase. La combinación de ambos marcajes revela la colocalización del péptido A β y CD222 en células infectadas. El recuadro muestra un área aumentada para señalar la colocalización con mayor detalle. Magnificación original 63x.

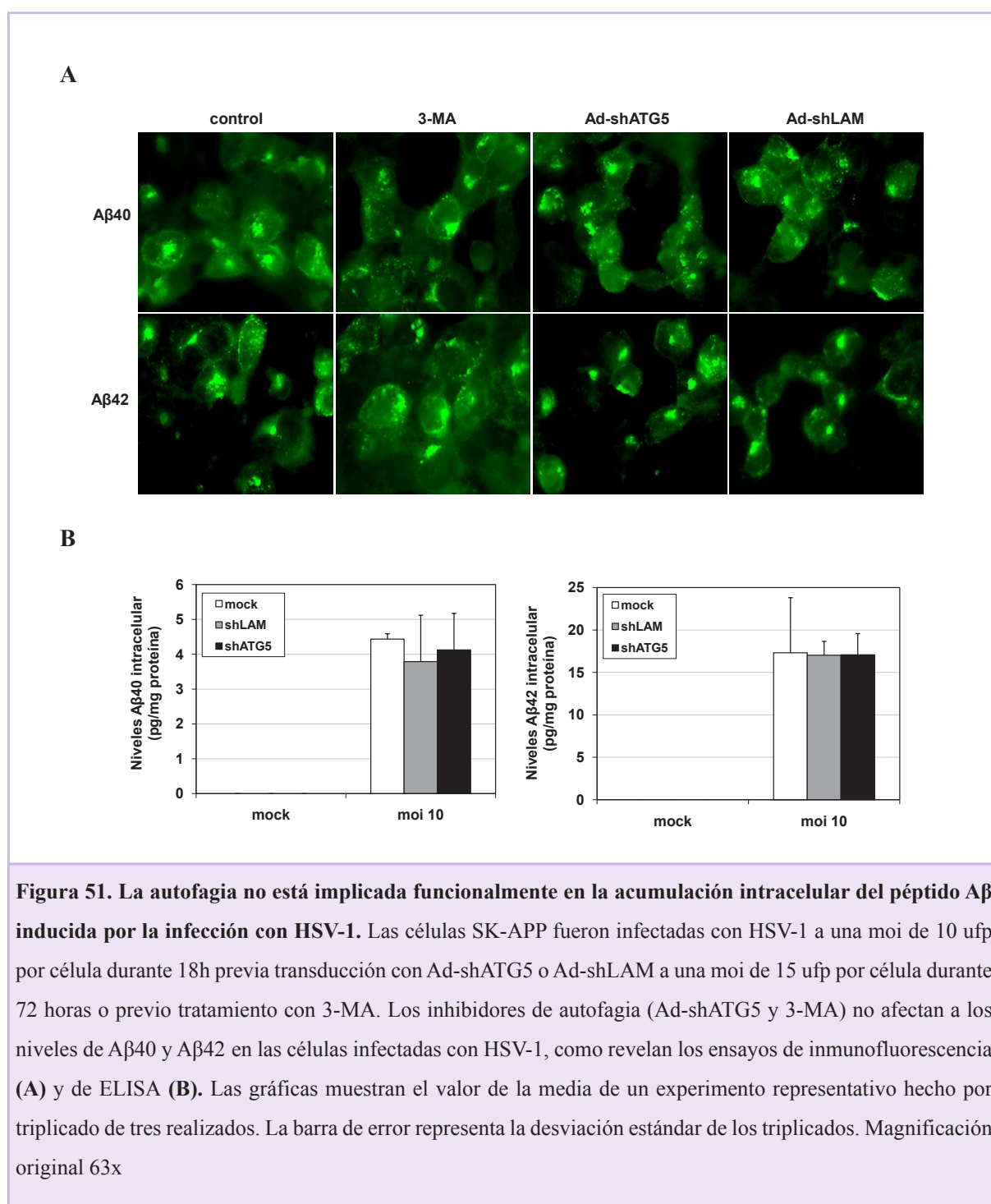
Este conjunto de datos sugiere la existencia de eventos de fusión entre vesículas autofágicas y endosomas tardíos en células infectadas con HSV-1, y que en estas estructuras se acumula el péptido A β intracelular como consecuencia de la infección con HSV-1. Sin embargo, la ausencia de colocalización del péptido A β y marcadores lisosomales, confirma la hipótesis de que los compartimentos autofágicos conteniendo A β no se fusionan con los lisosomas sugiriendo la activación de una respuesta autofágica incompleta en células infectadas con HSV-1.

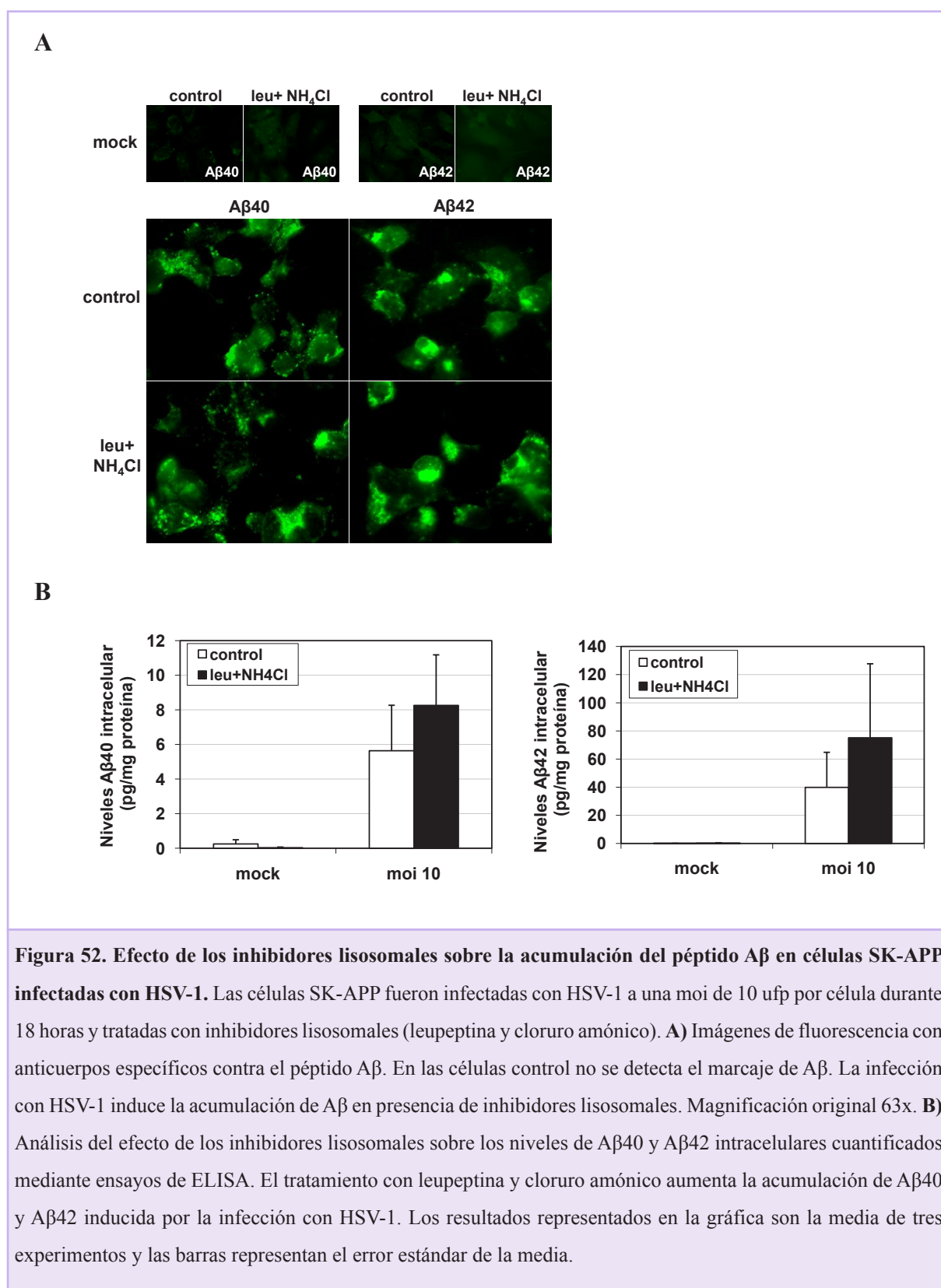
5.3.4. LA AUTOFAGIA NO ESTÁ IMPLICADA EN LA MODIFICACIÓN DE LOS NIVELES DEL PÉPTIDO A β INDUCIDA POR HSV-1.

La autofagia ha sido descrita como una de las vías implicadas en la generación del péptido A β (Yu y cols., 2005) y como la principal ruta de degradación de las proteínas anómalas intracelulares que se acumulan en las células como agregados proteicos (Ravikumar and Rubinsztein, 2004). Con el propósito de comprobar si la autofagia está funcionalmente implicada en la alteración de los niveles del péptido A β inducido por HSV-1, se estudió el efecto del silenciamiento de la expresión del gen esencial para la autofagia *ATG5* utilizando el adenovirus Ad-shATG5 (descrito en Resultados apartado 5.1.1.2). En primer lugar, se examinó si la ausencia de *ATG5* afectaba a la acumulación intracelular de A β inducida por HSV-1 en las células SK-APP mediante un análisis de inmunofluorescencia usando anticuerpos anti-A β . Los resultados indican que la infección con HSV-1 no modifica aparentemente la inmunorreactividad de A β 40 y A β 42 en las células transducidas con Ad-shATG5 en comparación con las células no transducidas o transducidas con Ad-shLAM. También se obtuvieron los mismos resultados tras el tratamiento con el 3-MA, un inhibidor farmacológico de la autofagia (Figura 51A).

Puesto que los estudios de inmunofluorescencia no son cuantitativos, se llevaron a cabo ensayos de ELISA con el fin de cuantificar diferencias más sutiles en los niveles de A β como consecuencia de la inhibición de la autofagia en las células SK-APP infectadas con HSV-1. De acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos de inmunofluorescencia, no se observaron alteraciones de los niveles de A β intracelular de las células transducidas con Ad-shATG5 (Figura 51B).

Finalmente, se examinó la implicación funcional de los lisosomas en la acumulación del péptido A β intracelular causada por la infección con HSV-1. La inhibición de la función lisosomal, con leupeptina y cloruro amónico, no afectaba aparentemente a la acumulación de estructuras que contenían el péptido A β en las células infectadas con HSV-1 (Figura 52A). Además, los inhibidores lisosomales producen un aumento no significativo de los niveles de las dos especies del péptido A β en las células infectadas con HSV-1, como revelaron los ensayos de ELISA realizados (figura 52B). Los experimentos realizados con inhibidores de la autofagia y de la función lisosomal indican que la autofagia no está funcionalmente implicada en la acumulación de A β intracelular inducida por HSV-1.





5.4. EFECTOS DE LA INTERACCIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA INFECCIÓN CON HSV-1 SOBRE LOS MARCADORES DE NEURODEGENERACIÓN EN LOS MODELOS CELULARES DE INFECCIÓN.

5.4.1. EL ESTRÉS OXIDATIVO INHIBE LA INFECCIÓN CON HSV-1 EN MODELOS NEURONALES.

El envejecimiento es el factor de riesgo más establecido de la EA. El estrés oxidativo asociado al envejecimiento está implicado en la enfermedad de Alzheimer (Nunomura y cols., 2006), constituyendo el primer acontecimiento en la patogénesis de la enfermedad (Nunomura y cols., 2001). En los últimos años, nuestro laboratorio ha empleado el sistema Xantina/Xantina oxidasa (XXO) con el fin de generar estrés oxidativo en los modelos celulares (White y cols., 1998), obteniendo resultados interesantes respecto a la muerte neuronal apoptótica característica de la neurodegeneración de la EA (Recuero y cols., 2009).

Como primera aproximación para estudiar la interacción entre el estrés oxidativo y la infección con HSV-1, se analizó si el tratamiento con XXO tenía algún efecto sobre la eficiencia de infección con HSV-1. En primer lugar, se analizó el efecto del estrés oxidativo sobre la acumulación de proteínas virales en células SK-N-MC infectadas a distintas dosis virales durante 42 horas. Como se muestra en la figura 53A, el tratamiento con XXO induce una disminución del número de células infectadas analizado por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo que reconoce distintas glicoproteínas virales. Por otra parte, se analizaron mediante WB los niveles de VP16 en células infectadas con HSV-1 en ausencia o presencia de XXO (Figura 53B). Los resultados revelan que el tratamiento con XXO induce una marcada reducción de los niveles de la proteína viral tardía VP16 sugiriendo una inhibición parcial de la infección.

A continuación, con el fin de confirmar que la infección con HSV-1 estaba atenuada por el estrés oxidativo, se realizó un experimento en células SK-N-MC tratadas con XXO e infectadas con HSV-1 durante 42 horas en el que se cuantificaron los niveles de DNA viral mediante PCR cuantitativa utilizando un ensayo específico para el gen *US12* de HSV-1. El tratamiento con XXO redujo significativamente la cantidad de DNA viral en las células SK-N-MC infectadas con HSV-1 respecto a las células sin tratar (moi 0.1: $p=0.007$; moi 1: $p=0.0001$) (Figura 54A). Además, se determinó el título viral de la fracción extracelular e intracelular en células SK-N-MC infectadas con HSV-1 a una moi de 1 ufp por célula durante 18 y 42 horas. La figura 54B muestra que el tratamiento con XXO induce una disminución muy acusada (cercana al 90%) y significativa del título viral intracelular y extracelular (18 horas: intracelular: $p=6.96 \times 10^{-10}$, extracelular: 9.29×10^{-7} ; 42 horas: intracelular: 4.79×10^{-7} , extracelular: 3.82×10^{-6}) con respecto a las células infectadas sin tratar a ambos tiempos.

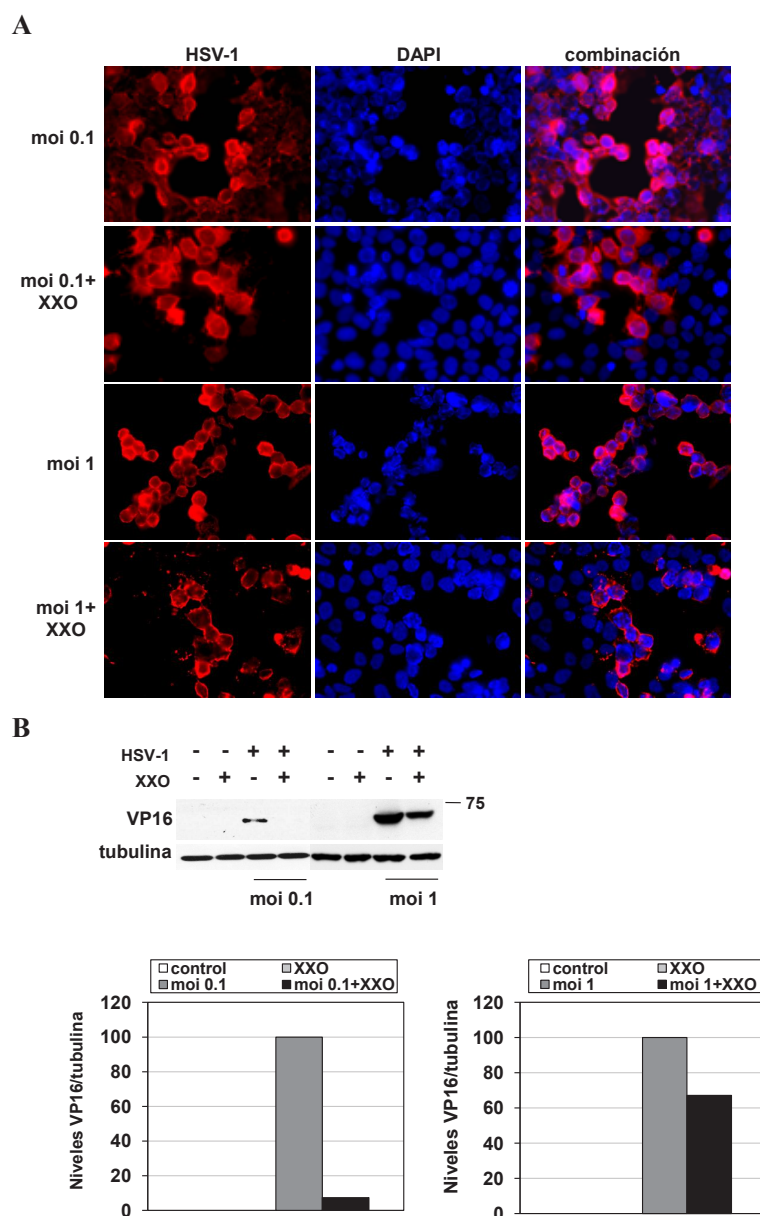
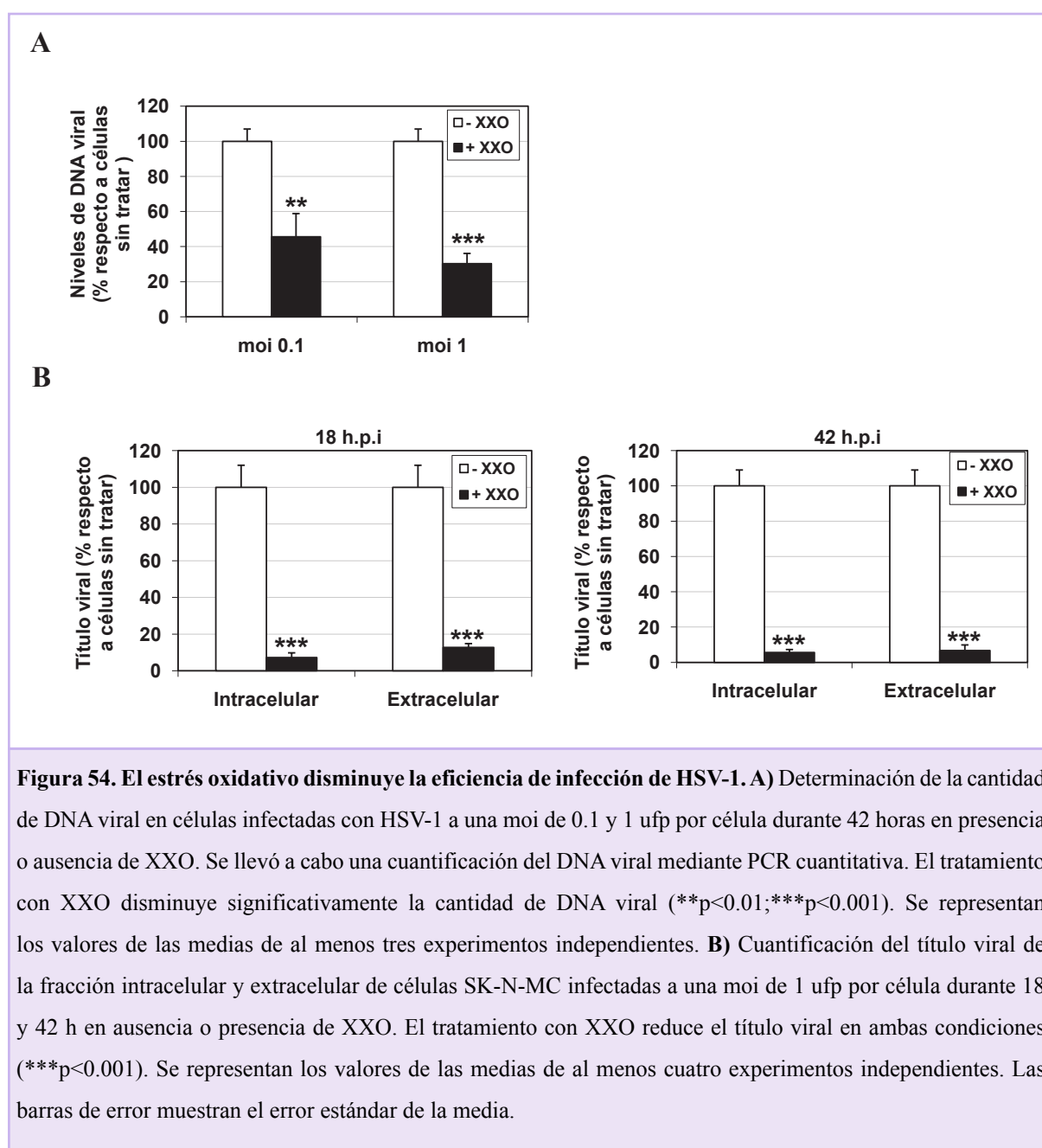


Figura 53. El estrés oxidativo disminuye los niveles de proteínas virales. Las células SK-N-MC fueron tratadas con XXO e infectadas con HSV-1 a una moi de 0.1 y 1 ufp por célula durante 42 horas. **A)** Se analizó la inmunorreactividad del anticuerpo anti-HSV-1 mediante inmunofluorescencia. En la figura se muestra la tinción de los núcleos con DAPI. Magnificación original 63x. **B)** Análisis mediante WB utilizando el anticuerpo anti-VP16. Se muestra el WB de tubulina como control de carga de proteína. La gráfica representa los niveles de VP16 normalizados por tubulina expresados en porcentaje respecto a las células infectadas. Se muestra un experimento representativo de cuatro realizados.



El conjunto de estos resultados indican que el estrés oxidativo afecta de una forma profunda a la eficiencia de infección de células neuronales por HSV-1, impidiendo la formación de partículas virales infectivas.

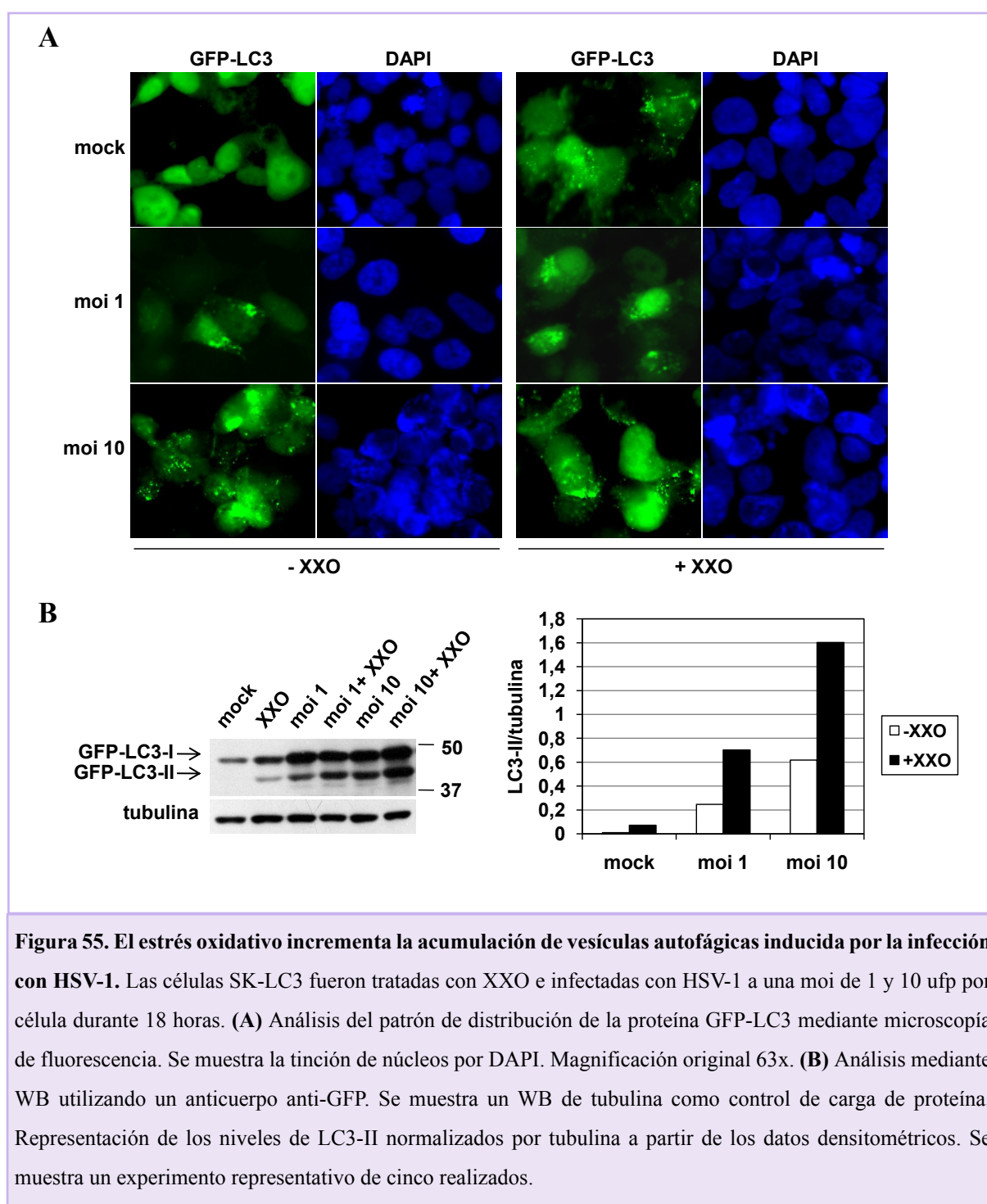
5.4.2. EFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO SOBRE MARCADORES DE NEURODEGENERACIÓN EN CÉLULAS INFECTADAS CON HSV-1.

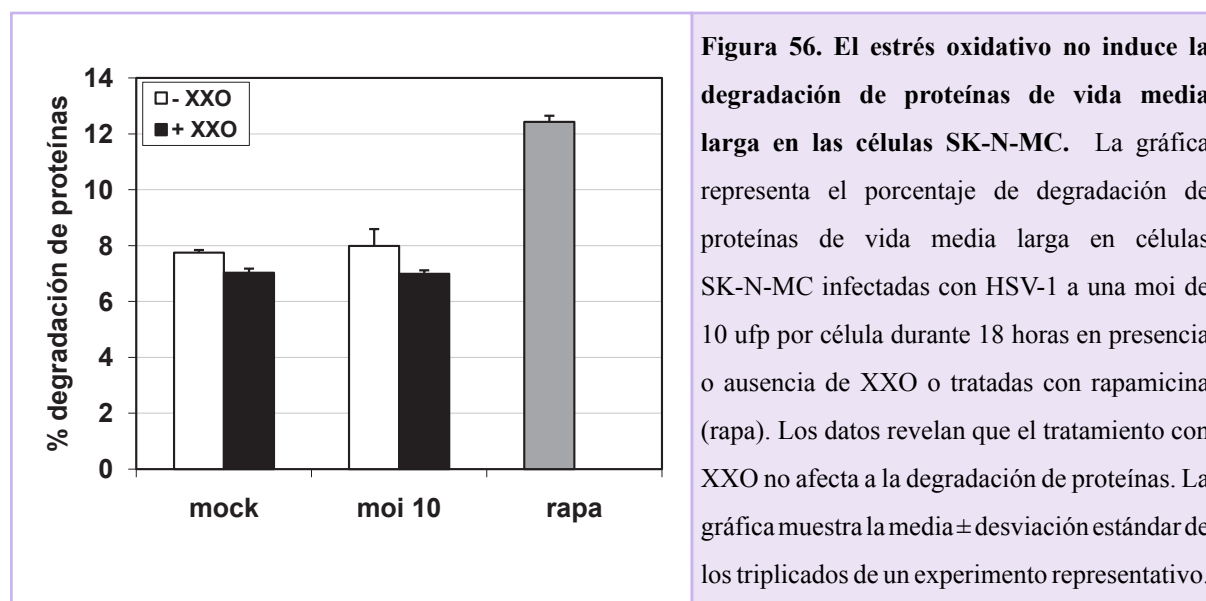
5.4.2.1. El estrés oxidativo incrementa la acumulación de autofagosomas inducida por la infección con HSV-1.

Como el estrés oxidativo inducía una inhibición parcial de la infección con HSV-1, se analizó si también afectaba a los marcadores de neurodegeneración inducidos por la infección con HSV-1. En primer lugar, la observación de GFP-LC3 mediante microscopía de fluorescencia, reveló que el estrés oxidativo produce un patrón de marcaje punteado de GFP-LC3, característico de vesículas autofágicas, claramente diferenciable del patrón citosólico de las células sin tratar (Figura 55A). Este marcaje es similar al observado en células infectadas con HSV-1. Este mismo efecto es producido por la combinación de la infección con HSV-1 y el tratamiento con XXO.

Para cuantificar la formación de autofagosomas inducida por el HSV-1 y el estrés oxidativo se analizaron por WB lisados de células infectadas con HSV-1 en ausencia o presencia de XXO. Los resultados muestran que los niveles de GFP-LC3-II en células control son prácticamente indetectables. Por el contrario, se puede detectar la inducción de la lipidación de GFP-LC3 causada por el tratamiento con XXO y por la infección con HSV-1 de una forma dependiente de la dosis viral. Además, se detectaron niveles superiores de GFP-LC3-II al combinarse la infección con el estrés oxidativo. El análisis de los datos densitométricos, reveló que el estrés oxidativo induce la acumulación de GFP-LC3-II, aunque en menor cantidad que la infección con HSV-1, y que la combinación de estrés oxidativo y la infección con HSV-1 tiene un efecto aditivo en la acumulación de GFP-LC3-II y, por tanto, en la acumulación de autofagosomas (Figura 55B).

A continuación, para comprobar si la acumulación de vesículas autofágicas y el incremento de GFP-LC3-II inducido por el tratamiento con XXO se traducían en un incremento de la degradación autofágica, se llevó a cabo un experimento de degradación de proteínas de vida media larga en células SK-N-MC. El análisis del efecto del estrés oxidativo mostró que el porcentaje de degradación de proteínas no se alteraba con el tratamiento con XXO ni en los cultivos control ni en los infectados con HSV-1 (Figura 56). A su vez, se comprobó la competencia de las células SK-N-MC en la ejecución del proceso autofágico empleando el inductor de autofagia rapamicina.





Estos resultados indican que el estrés oxidativo afecta al proceso autofágico de una forma similar a como lo hace la infección con HSV-1, causando la acumulación de vesículas autofágicas pero sin afectar la degradación autofágica de proteínas. Además, ambos estímulos podrían actuar conjuntamente induciendo una respuesta autofágica incompleta.

5.4.2.2. El estrés oxidativo modifica el procesamiento de APP inducido por la infección con HSV-1.

En los apartados anteriores, se ha demostrado que el tratamiento de las células con el sistema generador de estrés oxidativo, XXO, reduce la eficiencia de la infección con HSV-1 de las células SK-N-MC e incrementa la acumulación de autofagosomas inducida por la infección. Con el fin de profundizar en los efectos del estrés oxidativo y de su interacción con la infección sobre la aparición de marcadores de neurodegeneración, se realizaron ensayos de microscopía confocal en células SK-APP infectadas con HSV-1 durante 18 y 48 horas en presencia o ausencia de XXO para detectar el péptido A β intracelular empleando anticuerpos específicos que reconocen los péptidos A β 40 y A β 42 (figura 57). Los resultados confirmaron que la infección con HSV-1 inducía un marcado aumento del péptido A β intracelular (ver apartado de Resultados 5.2.1). Sin embargo, no se observa la acumulación de A β intracelular en células tratadas con XXO. La combinación de ambos estímulos, HSV-1 y XXO, también induce la aparición de un fuerte marcaje concentrado en determinadas zonas de la célula tanto del péptido A β 40 como del A β 42.

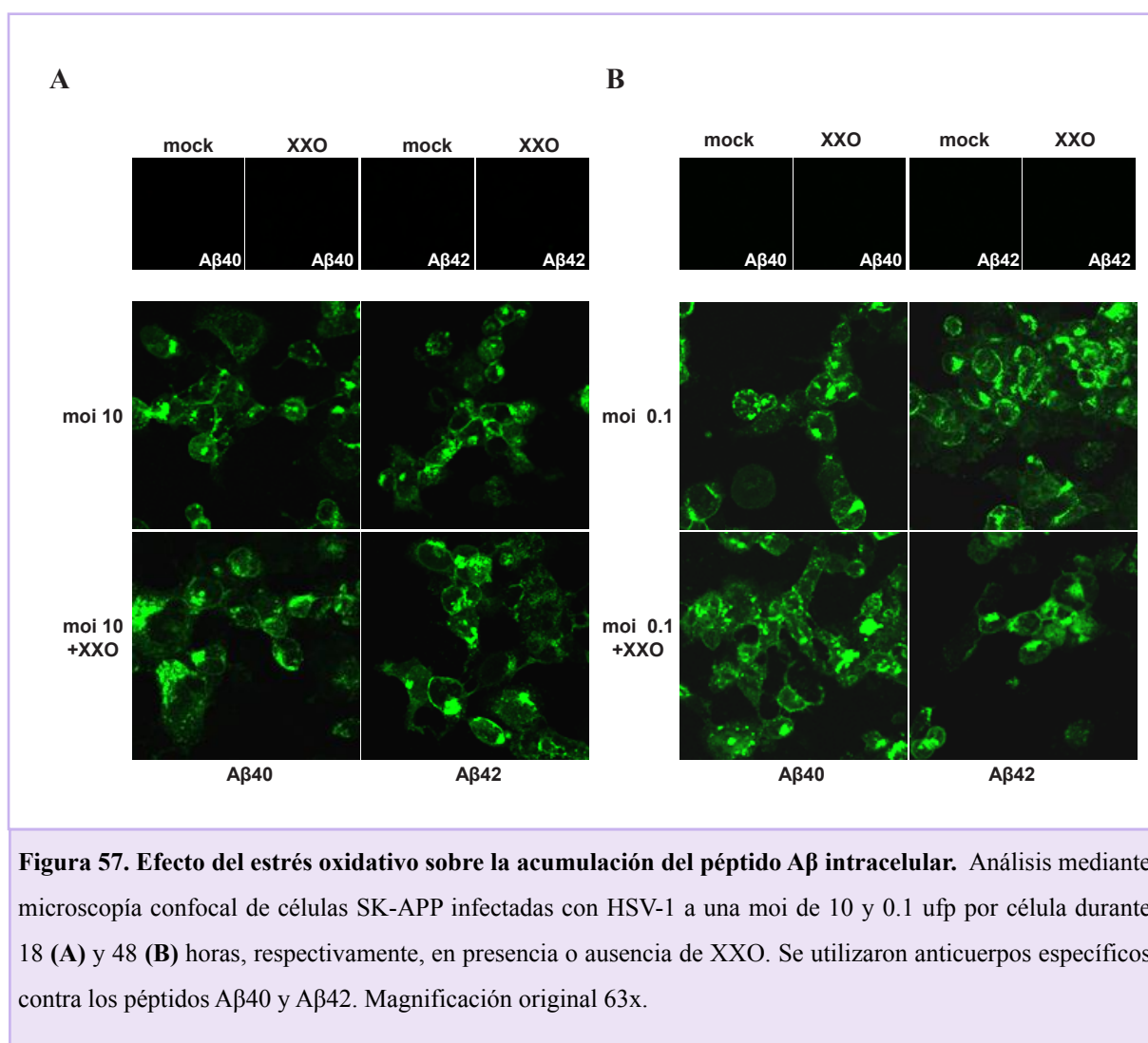


Figura 57. Efecto del estrés oxidativo sobre la acumulación del péptido A β intracelular. Análisis mediante microscopía confocal de células SK-APP infectadas con HSV-1 a una moi de 10 y 0.1 ufp por célula durante 18 (A) y 48 (B) horas, respectivamente, en presencia o ausencia de XXO. Se utilizaron anticuerpos específicos contra los péptidos A β 40 y A β 42. Magnificación original 63x.

Los experimentos de microscopía confocal no permitieron confirmar si el estrés oxidativo afectaba a la acumulación de A β inducida por HSV-1. Así, con el fin de cuantificar los niveles del péptido A β secretado e intracelular en células SK-APP infectadas con HSV-1 durante 18 horas en presencia o en ausencia de XXO, se llevaron a cabo ensayos de ELISA (Figura 58). El tratamiento con XXO produce una disminución significativa, aunque inferior a la causada por la infección, de los niveles de A β 40 y A β 42 secretado. Además, se observa un efecto aditivo en la disminución de los niveles de ambos péptidos al combinarse la infección con HSV-1 y el tratamiento con XXO (Figura 58A). Este mismo efecto se observa cuando la infección se realiza en unas condiciones de infección más fisiológicas (moi 0.1 ufp por célula durante 48 horas) (Figura 58B). Por otra parte, experimentos preliminares indican que el estrés oxidativo induce un aumento de los niveles intracelulares de los péptidos A β 40 y A β 42 en las células SK-APP infectadas con HSV-1 (Figura 58C).

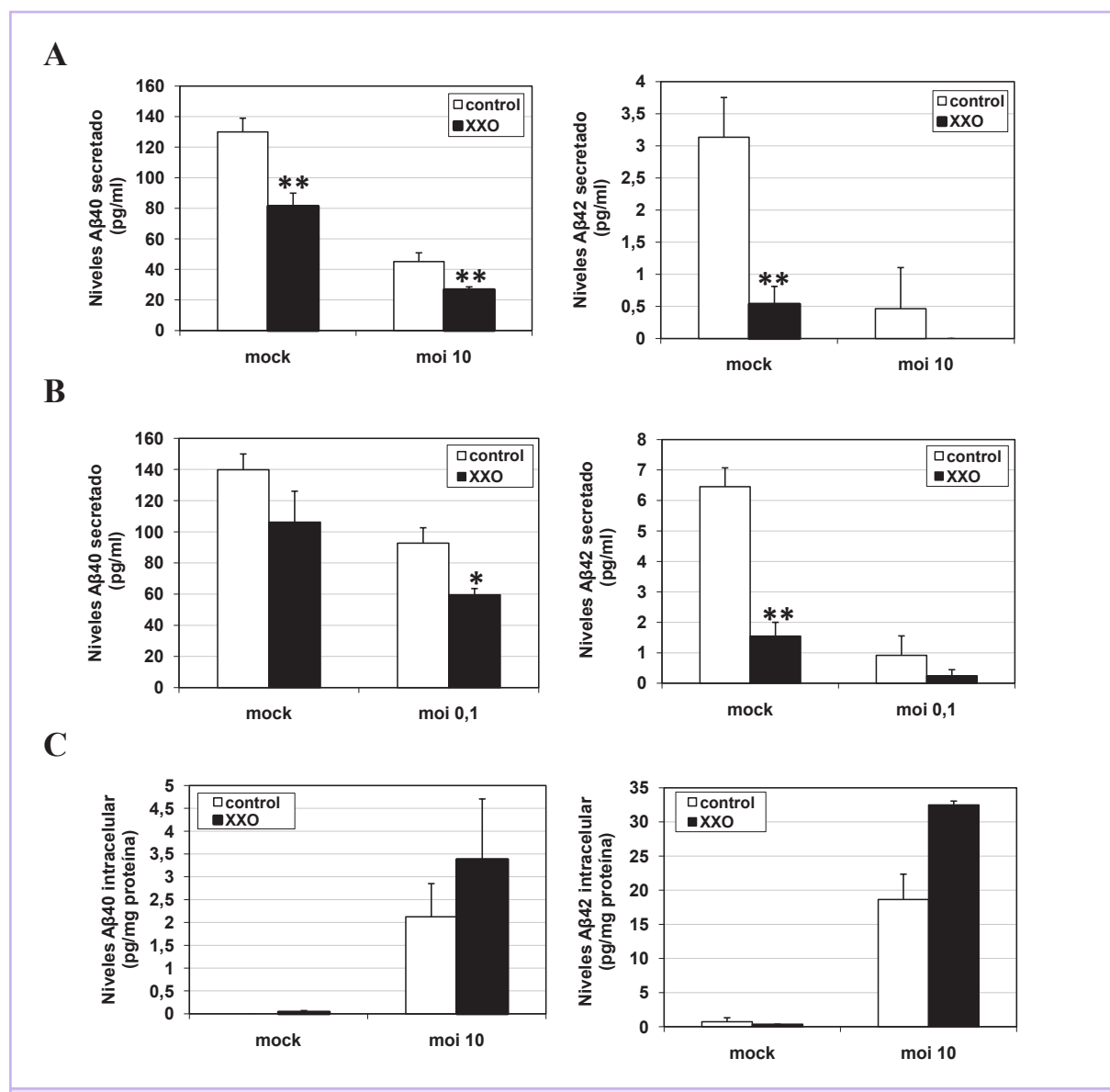


Figura 58. El estrés oxidativo modifica los niveles del péptido A β secretado e intracelular en células SK-APP. A y B) Las gráficas muestran los niveles de A β 40 y A β 42 en los sobrenadantes de cultivo de células SK-APP tratadas con XXO e infectadas con HSV-1 a una moi de 10 y 0.1 ufp por célula durante 18 (A) y 48 horas (B), respectivamente. Los asteriscos señalan las condiciones en las que los niveles de A β disminuyen significativamente en las células tratadas con XXO respecto a las células sin tratar (**p<0.01; *p<0.05) Los datos representados corresponden a las medias de cinco experimentos independientes. Las barras de error representan el error estándar de la media. C) Representación de los niveles de A β 40 y A β 42 intracelular de células SK-APP infectadas con HSV-1 a una moi de 10 ufp por célula durante 18 horas. La gráfica corresponde a un experimento representativo realizado por triplicado. Las barras de error representan la desviación estándar de los triplicados.

Los resultados de los ensayos de ELISA demuestran que el estrés oxidativo altera el procesamiento del APP exacerbando los efectos de la infección con HSV-1 sobre los niveles del péptido A β intracelular y secretado. Esto unido al hecho de que el estrés oxidativo aumenta la acumulación de vesículas autofágicas inducida por HSV-1 y a que el estrés oxidativo inhibe la eficiencia de la infección, revela una interacción muy compleja entre ambos factores.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN.

6.1. HIPÓTESIS INFECCIOSA DE LA EA. IMPLICACIÓN DEL HSV-1.

La enfermedad de Alzheimer esporádica es un síndrome muy complejo que presenta una etiología de naturaleza multifactorial (Blennow y cols., 2006). Sin embargo, aún teniendo en cuenta todos los factores de riesgo, tanto genéticos como ambientales, relacionados con la EA, ésta no puede ser explicada en su totalidad. En las últimas décadas se ha reforzado la hipótesis de una etiología infecciosa de la EA (Holmes and Cotterell, 2009; Honjo y cols., 2009). Así, diferentes estudios han demostrado la asociación con la EA de tres tipos de bacterias: espiroquetas (Miklossy y cols., 1994), *Chlamydia pneumoniae* (Balin y cols., 1998) y *Helicobacter pylori* (Kountouras y cols., 2006). Además, tanto *Chlamydia* como espiroquetas pueden causar la acumulación de A β (Little y cols., 2004; Miklossy y cols., 2006) y, por tanto, estar implicados en el desarrollo de la patogénesis de la EA. También se ha relacionado la infección con diferentes virus con la patología de la EA esporádica. Es el caso del Herpesvirus humano 6 (HHV6) y el citomegalovirus (CMV) (Lin y cols., 2002).

Sin embargo, el HSV-1 es el patógeno que se ha asociado más claramente con un riesgo de padecer la EA (Dobson y cols., 2003). Una serie de datos sugerían esta asociación. El HSV-1 es un virus ubicuo consistente con la alta proporción de personas que padecen la EA y, además, tiene la capacidad de establecer latencia en el ganglio trigémino permaneciendo en el sistema nervioso durante toda la vida del individuo, hecho que está en concordancia con la aparición de la EA esporádica en la edad avanzada. Finalmente, durante la encefalitis herpética, las principales regiones afectadas son la corteza frontal y temporal y el hipocampo, las mismas áreas que presentan los principales cambios patológicos en la EA (Ball, 1982). Basado en estas premisas, en las dos últimas décadas, muchos laboratorios han investigado la relación entre HSV-1 y la patogénesis de la EA. La primera evidencia experimental procede de la detección de DNA viral en una alta proporción de cerebros envejecidos, en las regiones más afectadas por la EA (Jamieson y cols., 1991; Jamieson y cols., 1992). Además, se ha demostrado que la reactivación del virus bajo condiciones de estrés o inmunosupresión da lugar a infecciones productivas que podrían causar neurodegeneración (Wozniak y cols., 2005). La infección latente con HSV-1 también es capaz de causar daño oxidativo e inflamación crónica, eventos generalmente asociados a cerebros de EA (Boggian y cols., 2000; Valyi-Nagy y cols., 2000). Posteriormente, datos epidemiológicos demostraron que la posesión de un alelo APOE- ϵ 4 unido a la presencia de HSV-1 en el cerebro confieren un alto riesgo de desarrollo de la EA esporádica. Este riesgo es mayor que el que ambos factores confieren por separado (Itzhaki y cols., 1997; Itzhaki y cols., 1998; Lin y cols., 2002). Además, estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio han

demostrado que la neuroinvasión de HSV-1 es dependiente de la dosis génica y del genotipo de *APOE* (Burgos y cols., 2002), siendo ApoE- ϵ 4 más eficiente que ApoE- ϵ 3 en el acceso del virus al cerebro (Burgos y cols., 2003), y que durante la infección aguda y latente, la carga viral en el cerebro es mayor en ratones portadores del alelo APOE- ϵ 4 humano que en los portadores del alelo APOE- ϵ 3 (Burgos y cols., 2006). Estos datos establecen un nexo funcional entre estos dos factores de riesgo sugiriendo que ApoE juega un papel importante en el acceso de HSV-1 al cerebro.

A continuación, aparecieron numerosas evidencias relacionando el HSV-1 y las marcas histopatológicas de la EA. En primer lugar, la glicoproteína gB de HSV-1 posee una secuencia de alta homología con el péptido A β y polipéptidos sintéticos de esta región aceleran la agregación de A β (Cribbs y cols., 2000). En segundo lugar, otra proteína del HSV-1, Us11, se une a la proteína asociada a microtúbulos PAT1 que está implicada en el transporte de APP (Benboudjema y cols., 2003) y durante el transporte del virus a través de los axones, HSV-1 se asocia con APP causando posiblemente un procesamiento anormal de la proteína que promueve la generación de A β (Satpute-Krishnan y cols., 2003). Además, recientemente se ha demostrado que la mayor parte del DNA de HSV-1 encontrado en cerebros de pacientes de EA se localiza en las placas seniles (Wozniak y cols., 2009b). Finalmente, se ha descrito que HSV-1 induce la hiperfosforilación de tau (Wozniak y cols., 2009a; Zambrano y cols., 2008) y un incremento de los niveles del péptido A β intracelular (Wozniak y cols., 2007). Estudios recientes demuestran que la acumulación del péptido A β intracelular es el principal evento patogénico de la EA y que precede a la formación de las placas seniles extracelulares (LaFerla y cols., 2007), promoviendo los procesos de muerte neuronal (Takahashi y cols., 2004). Tomando en consideración todas estas evidencias experimentales, además de los resultados descritos en esta tesis, la infección con HSV-1 podría provocar un aumento de procesos inflamatorios en el cerebro y contribuir a la formación de las placas seniles y los ovillos neurofibrilares característicos de los cerebros de la EA.

Recientemente se ha descrito que la autofagia, o concretamente la disfunción del proceso autofágico, es uno de los procesos que puede explicar la acumulación de agregados de proteínas anómalas en diferentes enfermedades neurológicas y, especialmente, en la EA (Nixon y cols., 2005; Yu y cols., 2004b). Además, el HSV-1 es capaz de controlar la actividad de la vía autofágica a través del factor viral de neurovirulencia ICP34.5 (Talloczy y cols., 2002; Talloczy y cols., 2006). Aún se desconocen las causas y los mecanismos subyacentes en el mal funcionamiento del proceso autofágico en la EA, pero la infección con HSV-1 podría estar implicada en esta disfunción. Con estos antecedentes, nos propusimos el desarrollo de modelos celulares de infección con HSV-1 con la intención de estudiar el estado de la autofagia en las células infectadas

y la relación funcional de la autofagia con la aparición de marcadores de la neurodegeneración característica de la EA, especialmente la acumulación del péptido A β . Por otra parte, el estrés oxidativo es uno de los eventos más tempranos en la patogénesis de la EA, desempeñando un papel importante en el desarrollo de la neurodegeneración (Zhu y cols., 2004). Además, la infección latente con HSV-1 está asociada a la aparición de daño oxidativo en las neuronas (Valyi-Nagy y cols., 2000). Por todo ello, se analizó el papel del estrés oxidativo y su posible interacción con HSV-1 en la inducción de los marcadores de neurodegeneración característicos de la EA.

6.2. INDUCCIÓN DE UNA RESPUESTA AUTOFÁGICA INCOMPLETA POR HSV-1.

En primer lugar, se realizó una serie de experimentos para comprender la relación entre el virus HSV-1 y el proceso autofágico. El análisis de la lipidación de LC3 es el parámetro más universalmente utilizado para el estudio de la autofagia (Mizushima, 2004). Por ello, se ha generado un modelo celular basado en la línea celular de neuroblastoma humano SK-N-MC con el fin de monitorizar el proceso de autofagia en los modelos de infección. Este sistema consiste en la expresión de manera estable del marcador de autofagia, LC3, como proteína de fusión GFP-LC3. La comprobación experimental de que esta línea celular es capaz de responder a estímulos autofágicos clásicos, como la rapamicina o la privación de nutrientes, detectándose la aparición de vesículas autofágicas y la degradación de proteínas de vida media larga, confirma que este modelo celular es adecuado para el estudio de las consecuencias de la infección con HSV-1 sobre la autofagia.

El análisis de los resultados obtenidos a partir de la monitorización de GFP-LC3 permite concluir que HSV-1 induce la acumulación de GFP-LC3-II y su incorporación en las vesículas autofágicas de una manera dependiente del tiempo y de la dosis viral. En condiciones fisiológicas, las vesículas autofágicas presentan una vida media muy corta siendo rápidamente eliminadas tras su fusión con los lisosomas. De este modo la acumulación de vesículas autofágicas en células infectadas podría interpretarse como un aumento de la activación de la autofagia como consecuencia de la infección. Sin embargo, la acumulación de vesículas autofágicas no se correlaciona con un aumento de la degradación de proteínas. De acuerdo con nuestros resultados, en otros modelos celulares de infección no se ha detectado un aumento de la degradación de proteínas en las células infectadas con HSV-1 salvaje. Sólo una cepa mutante que carece de la proteína ICP34.5 es capaz de incrementar la actividad de la vía autofágica (Talloczy y cols., 2002). La proteína ICP34.5 inhibe la autofagia mediante dos mecanismos, uno que implica la defosforilación de eIF2 α (Chou y cols., 1995; He y cols., 1997) y otro que requiere la unión directa de ICP34.5 con una proteína esencial en las primeras etapas de la autofagia, la beclina 1, causando su inhibición (Orvedahl y cols., 2007). Este efecto no es

exclusivo de la infección con HSV-1. Otros virus que causan enfermedades humanas, como el Coxsackievirus B3 (Wong y cols., 2008), poliovirus (Taylor and Kirkegaard, 2008) y el virus de la hepatitis C (Sir y cols., 2008), también inducen una autofagia anómala caracterizada por una intensa acumulación de autofagosomas.

Se ha descrito que la proteína de fusión GFP-LC3, especialmente en condiciones de sobreexpresión, tiende a asociarse con agregados de proteínas de una manera independiente del proceso autofágico (Kuma y cols., 2007). Para excluir la posibilidad de un artefacto experimental debido a la sobreexpresión de GFP-LC3, se comprobó la acumulación de LC3-II endógeno en el neuroblastoma SK-N-MC infectado con HSV-1 y se obtuvieron los mismos resultados que en la línea celular SK-LC3. Además, se llevaron a cabo experimentos con inhibidores del proceso autofágico, para descartar una mala interpretación de la acumulación de LC3-II. El tratamiento con 3-MA, el inhibidor farmacológico más utilizado para bloquear la autofagia, redujo la acumulación de LC3-II. El 3-MA ejerce su inhibición sobre la fosfoinositol 3 quinasa (PI3K), implicada en las primeras etapas del proceso autofágico (Seglen and Gordon, 1982). Sin embargo, esta quinasa controla múltiples procesos celulares, por lo que el 3-MA tiene una serie de efectos pleiotrópicos. Por ello, se diseñó una herramienta para inhibir de forma más específica el proceso autofágico basada en la técnica de RNA de interferencia. Estudios previos han demostrado que en células deficientes para el gen *ATG5* no se produce la acumulación de vesículas autofágicas incluso bajo condiciones de privación nutricional. La proteína Atg5 es imprescindible para la modificación postraducciona de LC3 y para la formación final de los autofagosomas (Mizushima y cols., 2001). Teniendo en cuenta estos antecedentes, se generó un adenovirus que expresa un shRNA dirigido contra el gen *ATG5*, con el objetivo de inhibir la expresión de dicho gen y, por tanto, el proceso autofágico y así poder determinar los eventos dependientes de la activación de autofagia. Los resultados evidenciaron que el adenovirus generado silencia la expresión del gen *ATG5* endógeno con una gran eficiencia. Como consecuencia de ello, Ad-shATG5 inhibe de forma acusada la acumulación de autofagosomas inducida por la infección con HSV-1 indicando que el incremento de inmunorreactividad de LC3-II en las células infectadas es de origen autofágico. Esto convierte al Ad-shATG5 en una herramienta muy potente que permite el estudio del proceso autofágico inducido por HSV-1.

Los datos obtenidos con los inhibidores virales confirmaron que la respuesta autofágica está inducida específicamente por la infección pero que no es necesaria una infección productiva para la acumulación de las vesículas autofágicas. Adicionalmente, se estudió si alguna proteína viral intervenía funcionalmente en los efectos inducidos sobre la autofagia. Los resultados obtenidos con el inhibidor de la síntesis de proteínas cicloheximida, evidenciaron que el proceso es dependiente de la síntesis de proteínas virales.

Como se ha comentado anteriormente, la acumulación masiva de vesículas autofágicas en células infectadas con HSV-1 no repercute en un aumento de la degradación autofágica de proteínas. Estos datos indican que HSV-1 ejerce un control muy profundo del proceso autofágico. Por ello, aunque la infección con HSV-1 induce una acumulación de autofagosomas, es necesario distinguir entre un aumento de la formación de autofagosomas y, por tanto, un incremento en la actividad autofágica, o una disminución del reciclaje de los autofagosomas por un bloqueo de su fusión con los lisosomas o una inhibición de la función degradativa lisosomal. Debido a esto, la monitorización del marcador de autofagia LC3 tiene que ser complementada con el análisis del flujo autofágico y de este modo poder interpretar los resultados de manera correcta (Klionsky y cols., 2008). Una metodología que permite la medida del flujo autofágico incluye el análisis de los niveles de LC3 en presencia de inhibidores lisosomales que impiden su degradación (Mizushima and Yoshimori, 2007). El tratamiento con inhibidores lisosomales, indujo un pequeño aumento de los niveles de LC3-II en las células infectadas con HSV-1. Este aumento fue mucho menor que el observado en las células sin infectar o tratadas con rapamicina, indicando que la infección con HSV-1 induce una disminución intensa del flujo autofágico. Otro método alternativo para la detección del flujo autofágico es el análisis de la proteína p62 (Bjorkoy y cols., 2009). p62 se une directamente a la proteína LC3 y es degradada específicamente mediante el proceso autofágico (Bjorkoy y cols., 2005). Debido a esto, la acumulación de p62 se utiliza como un marcador de la inhibición de la autofagia o de defectos en la degradación autofágica (Nakai y cols., 2007; Wang y cols., 2006). Nuestros resultados muestran que la proteína p62 se acumula durante la infección con HSV-1 y que, mayoritariamente, se localiza en los compartimentos autofágicos. Estos datos podrían indicar una actividad autofágica deficiente como resultado de la infección con HSV-1. Además, mediante microscopía electrónica en células infectadas con HSV-1 se detectaron los diferentes compartimentos autofágicos pero no se observaron autolisosomas con material citosólico en degradación. Profundizando más en el estudio de la inhibición del flujo autofágico inducido por HSV-1, se identificaron bajos niveles de colocalización de LC3 con el marcador lisosomal CD63 tanto en presencia como en ausencia de inhibidores lisosomales. La ausencia de LC3 en los lisosomas en presencia de inhibidores de la función lisosomal es indicativo de que LC3 no está siendo rápidamente degradado en estos compartimentos. Por lo tanto, la infección con HSV-1 induce un fallo en la fusión de los autofagosomas con los lisosomas. El conjunto de estos resultados, permite concluir que aunque HSV-1 induce la acumulación de vesículas autofágicas, la actividad autofágica en células infectadas es similar a la de las células en condiciones nutricionales normales. Además, nuestros resultados demuestran por primera vez que la infección con HSV-1 interrumpe el flujo autofágico a nivel de la fusión de los autofagosomas con los lisosomas, estableciendo otro mecanismo de control de la autofagia adicional al que media la proteína viral ICP34.5. Los

resultados con cicloheximida indican que algún producto viral está funcionalmente implicado en la acumulación de autofagosomas. Actualmente, estamos implicados en la investigación de las proteínas virales causantes de este defecto. En este sentido, recientemente se ha descrito que la proteína de la matriz M2 del virus de la Influenza A inhibe la fusión de vesículas autofágicas y lisosomas impidiendo la formación de autolisosomas (Gannage y cols., 2009). Esto sugiere que alguna proteína temprana o temprana-tardía del virus HSV-1 podría estar actuando de manera similar impidiendo la fusión de los autofagosomas con los lisosomas.

La autofagia ha sido identificada como un mecanismo de la inmunidad innata que protege de la invasión de los patógenos intracelulares (Kirkegaard y cols., 2004; Schmid y cols., 2006). En esta línea, se ha demostrado que en determinadas condiciones HSV-1 sufre una degradación autofágica (Talloczy y cols., 2006). Sin embargo, las bacterias y los virus han desarrollado diferentes estrategias para evadir la degradación autofágica e incluso utilizar la maquinaria autofagosomal para su propia replicación (Espert y cols., 2007). En nuestros modelos de infección, la inhibición del proceso autofágico mediado por la eliminación de la expresión de *ATG5* no causó variaciones apreciables en los niveles de DNA y proteínas virales así como en el título viral de células infectadas con HSV-1. Además, mediante microscopía electrónica apenas se observan viriones de HSV-1 englobados por membranas autofagosomales. Al contrario, la mayoría se encuentran libres en el citoplasma o rodeados por vesículas de salida de membrana única. La conformidad de estos resultados con otros trabajos recientes de la literatura (Alexander y cols., 2007; Jounai y cols., 2007) indican que la acumulación de autofagosomas en nuestros modelos celulares de infección no repercute positiva o negativamente en el crecimiento viral y, por lo tanto, el proceso autofágico no está implicado de forma relevante en la replicación ni en la degradación del virus HSV-1.

La facultad de HSV-1 de inhibir el proceso autofágico en diferentes tipos celulares a través de la acción de la proteína viral ICP34.5 está ampliamente establecida (Orvedahl y cols., 2007; Talloczy y cols., 2002). Sin embargo, los resultados obtenidos en nuestros modelos celulares parecen estar de acuerdo con los descritos por English y colaboradores en macrófagos infectados con HSV-1, donde HSV-1 podría inducir un tipo de autofagia caracterizado por la formación de autofagosomas a partir de la membrana nuclear en etapas tardías de la infección (English y cols., 2009). Desde las 9 h.p.i., en las células infectadas se acumulan autofagosomas clásicos de doble membrana y, además, aparecen estructuras emergentes formadas por protuberancias de la membrana nuclear que posteriormente se acumulan en el citoplasma de la célula como autofagosomas de cuatro membranas. Este tipo de autofagia nuclear podría estar implicado en la presentación de antígenos virales mediante el MHC de clase I y II (English y cols., 2009; Paludan y cols., 2005). En el trabajo de English y colaboradores demuestran que la glicoproteína

gB colocaliza con LC3 y es procesada y presentada por el MHC de clase I en la membrana plasmática. En nuestro modelo, la proteína LC3 también colocaliza con otra glicoproteína viral, gC, en estadios de la infección donde se inician la generación de las estructuras autofagosomales de cuatro membranas, indicando una posible relación funcional del proceso autofágico con la presentación de antígenos virales mediante el complejo MHC de clase I. Actualmente, estamos profundizando en la investigación de este proceso. Estas estructuras de múltiples membranas no se detectan en las células sin infectar o tratadas con rapamicina, lo que podría indicar que este tipo de autofagia nuclear podría ser una reacción de las células huésped ante la infección de HSV-1 como respuesta ante la inhibición por parte del virus de la vía autofágica clásica.

La autofagia está asociada con la prevención y patogénesis de diferentes enfermedades (Shintani and Klionsky, 2004) y también desempeña un papel importante en la defensa contra las infecciones virales (Espert y cols., 2007). Su papel es particularmente importante en el sistema nervioso central, donde el control de calidad de las proteínas y el recambio de orgánulos es más importante que en las células mitóticas (Boland and Nixon, 2006). Dos estudios recientes indican que el mantenimiento de la autofagia basal en neuronas de ratón es crítico para prevenir las enfermedades neurodegenerativas (Hara y cols., 2006; Komatsu y cols., 2006). También, existen algunas evidencias que sugieren que la autofagia desempeña un papel protector en procesos neurodegenerativos, especialmente en la EA (Florez-McClure y cols., 2007) (Nixon, 2007). Además, otro estudio demuestra una expresión reducida de beclina 1 en cerebros de EA y un incremento de la patología de EA en los ratones deficientes en beclina 1 (Pickford y cols., 2008). Por último, se ha descrito que la autofagia es un proceso muy activo en neuronas sanas y que la acumulación de vesículas autofágicas en el cerebro de pacientes de EA representa una eliminación ineficiente de los autofagosomas más que una marcada inducción de la autofagia (Boland y cols., 2008). En la línea de estos descubrimientos, la acumulación de autofagosomas inducida por HSV-1 demostrada en este trabajo, podría responder a un fallo en la fusión de autofagosomas y lisosomas. De esta manera, una autofagia defectiva inducida por la infección con HSV-1 podría contribuir a la neurodegeneración.

6.3. ALTERACIÓN DEL PROCESAMIENTO DE LA PROTEÍNA APP POR HSV-1.

Evidencias experimentales han revelado que la autofagia está funcionalmente implicada tanto en la generación del péptido A β (Nixon y cols., 2005; Yu y cols., 2005) como en la eliminación de los agregados de A β intracelular (Hung y cols., 2009). Por tanto, la acumulación de vesículas autofágicas inducida por HSV-1 podría estar relacionada con una alteración de los niveles de A β en nuestros modelos de infección. Para llevar a cabo este estudio, se utilizó un modelo celular que expresa establemente la proteína APP ya que las células de neuroblastoma

SK-N-MC no expresan niveles detectables de A β . Los resultados revelaron que la infección con HSV-1 inducía un aumento de los niveles del péptido A β intracelular, especialmente del péptido A β 42 en las células SK-APP. Estos resultados están de acuerdo con el hecho de que la mayoría del A β intraneuronal que se acumula corresponde a la isoforma de 42 aminoácidos (Gouras y cols., 2000). Para descartar la existencia de uniones inespecíficas o una reacción cruzada con el APP, en las células SK-APP se detectó el péptido A β utilizando diferentes anticuerpos específicos de 4 epítomos distintos: 6E10 (que reconoce los residuos 1 a 16 del péptido A β), 4G8 (que reconoce los residuos 17 a 24 del péptido A β) y dos anticuerpos específicos para A β 40 y A β 42, respectivamente. Todos los anticuerpos muestran una fuerte inducción de la inmunorreactividad de A β intracelular como consecuencia de la infección con HSV-1. Además, la infección con HSV-1 produce una disminución de los niveles de APP, característica de la inhibición general de la expresión de proteínas celulares inducida por el virus, descartando el hecho de que el incremento del péptido A β sea debido a un aumento de los niveles de APP.

Para confirmar que el incremento del péptido A β es debido específicamente a la infección con HSV-1, se analizó el efecto de dos inhibidores virales. La heparina, inhibidor de la entrada viral, revirtió completamente la acumulación del péptido A β intracelular. Sin embargo, el incremento del péptido A β no se ve afectado por el tratamiento con PAA, un inhibidor de la DNA polimerasa viral. Además, el tratamiento con cicloheximida reveló que la acumulación del péptido A β también es dependiente de la síntesis de proteínas virales. De esta forma, los inhibidores virales y de la síntesis proteica ejercen el mismo efecto sobre la acumulación de vesículas autofágicas y sobre la acumulación de A β intracelular, sugiriendo una posible conexión entre estos dos procesos. Los genes tardíos γ de HSV-1 se dividen en dos subclases: γ 1, cuya expresión está reducida en ausencia de la replicación viral y γ 2, en los que la síntesis de DNA viral es requerida para su expresión (Gao and Knipe, 1991). Por lo tanto, los productos virales necesarios para la acumulación de A β en vesículas autofágicas es probable que no correspondan al tipo γ 2 de genes tardíos de HSV-1. Por otra parte, la acumulación del péptido A β se inicia en estadios tempranos de la infección, a partir de 2 h.p.i., de acuerdo con el hecho de que el péptido A β se acumula antes de que comience la replicación de HSV-1 y, por tanto, es independiente de la misma. Además, la generación tan temprana del péptido A β en las células infectadas, sugiere la participación de proteínas virales de expresión temprana. Algunas de las proteínas de expresión temprana en el ciclo viral participan en la regulación de la expresión génica. De esta forma, el aumento de la expresión de genes celulares implicados en la acumulación del péptido A β y de las vesículas autofágicas podría constituir un posible mecanismo. Numerosas evidencias indican que la acumulación del A β intracelular es uno de los eventos más tempranos en la patogénesis de la EA (LaFerla y cols., 2007), y la infección con HSV-1, por tanto, podría

estar implicado en este proceso.

Existen numerosos estudios que demuestran que el incremento de la actividad β - o γ - secretasa conduce a la acumulación de $A\beta$ intracelular. Al examinar el efecto de HSV-1 sobre la actividad de las distintas secretasas implicadas en el procesamiento de APP, no se observa ningún cambio en la actividad β -secretasa a lo largo de la infección. Por el contrario, resultados preliminares indican que la actividad γ -secretasa aumenta desde etapas tempranas de la infección. Además, la infección con HSV-1 produce una marcada disminución de la actividad α -secretasa, detectable a 3 h.p.i., así como de sus productos proteolíticos α -CTF y $sAPP\alpha$, indicando la inhibición del procesamiento no amiloidogénico de la proteína APP. Estos mismos resultados se obtuvieron en condiciones endógenas en las células SK-N-MC, descartando la posibilidad de que la alteración inducida por HSV-1 en la vía no amiloidogénica fuera debido a la sobreexpresión de la proteína APP. Estos datos sugieren que la infección con HSV-1 favorece el procesamiento de APP a través de la vía amiloidogénica y que el aumento de los niveles de $A\beta$ intracelular observado en nuestro modelo de infección podría ser explicado, al menos en parte, por un aumento de la actividad γ -secretasa. Sin embargo, la intensa acumulación del péptido $A\beta$ como consecuencia de la infección, indica probablemente la participación de otros procesos celulares.

La acumulación del péptido $A\beta$ presenta un marcaje semejante al patrón de distribución de GFP-LC3 y LC3 endógeno en células infectadas. Los resultados derivados de los estudios de colocalización indican que una parte importante de las moléculas de LC3 y $A\beta$ se encuentran en la misma estructura celular, aportando un nuevo indicio acerca de la existencia de una conexión funcional entre los dos procesos. Una primera posibilidad es que la acumulación de vesículas autofágicas inducida por HSV-1 esté implicada en la generación del péptido $A\beta$. Así, en relación con la EA, se ha descrito la existencia de vesículas autofágicas en cerebros de ratones transgénicos que expresan APP humano. Estas vesículas contienen APP, distintas especies de $A\beta$ y los enzimas β - y γ -secretasa, necesarias para su generación. Además, las vesículas autofágicas han sido identificadas como uno de los reservorios del péptido $A\beta$ intracelular en el cerebro de estos ratones y de pacientes de EA (Yu y cols., 2005; Yu y cols., 2004b). Con el fin de analizar la implicación funcional del proceso autofágico en la generación de $A\beta$ en las células infectadas, se inhibió la expresión del gen *ATG5* y se analizó la acumulación de $A\beta$ en un contexto de autofagia no funcional. En estas condiciones no se produjo la acumulación de vesículas autofágicas. Sin embargo, la ausencia de autofagia no previno la acumulación del péptido $A\beta$, indicando que el proceso autofágico no está implicado funcionalmente en la generación de péptido $A\beta$ que se acumula en las células infectadas con HSV-1.

Una segunda posibilidad consiste en que la localización de $A\beta$ en las vesículas autofágicas

indique que el péptido A β es diana para la degradación lisosomal por la vía autofágica. Esto es consistente con que la autofagia es la principal ruta metabólica encargada de la degradación de proteínas agregadas y mutantes que están asociadas a enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Parkinson (Cuervo y cols., 2004) y de Huntington (Ravikumar y cols., 2004). Además, la autofagia ha sido señalada como un mecanismo que protege las neuronas frente a la neurotoxicidad del péptido A β (Hung y cols., 2009; Komatsu y cols., 2007). Entonces, defectos en la ejecución del proceso autofágico podrían causar la acumulación de vesículas autofágicas conteniendo A β que no sería degradado por los lisosomas resultando, en último término, en la acumulación intracelular del péptido. En este sentido, en cerebros de pacientes con la EA se ha observado una acumulación de vesículas autofágicas en neuronas afectadas y en neuritas distróficas asociadas con A β en placas seniles, sugiriendo una disfunción progresiva del proceso autofágico resultante en fallos en la fusión de las vesículas autofágicas con los lisosomas (Boland y cols., 2008; Nixon y cols., 2005). De acuerdo con estas evidencias, en nuestros modelos celulares la infección con HSV-1 induce una fuerte acumulación de vesículas autofágicas conteniendo A β . Estas vesículas no se fusionan eficientemente con los lisosomas y, por lo tanto, no tiene lugar un incremento de la degradación autofágica de proteínas, lo que indica que la infección con HSV-1 produce un bloqueo de la ejecución del proceso autofágico que podría causar una acumulación masiva del péptido A β en las vesículas autofágicas. Esta segunda posibilidad también está apoyada por el hecho de que la acumulación de A β sea anterior a la acumulación de las vesículas autofágicas. De esta forma los agregados de A β inducidos por la infección podrían ser reconocidos por la maquinaria autofágica para su eliminación. Esta eliminación es evitada por el bloqueo de la ejecución de la autofagia causado por el virus.

El lisosoma es otro de los orgánulos celulares donde se puede generar el péptido A β (Pasternak y cols., 2003). En este sentido, el incremento de A β podría deberse a un aumento del procesamiento proteolítico de APP en los lisosomas debido a la infección con HSV-1. Sin embargo, las estructuras celulares LC3 y A β positivas no colocalizan con el marcador lisosomal CD63 en las células infectadas con HSV-1, hecho que reduce esta posibilidad. Además, el tratamiento con inhibidores de la función lisosomal no causó una reducción de los niveles del péptido A β , excluyendo la posibilidad de que los lisosomas estén implicados en la producción de A β inducida por la infección. Más aún, la inhibición de la función lisosomal resultó en un incremento, aunque no significativo del péptido A β intracelular. Como el lisosoma es el orgánulo destino de la vía autofágica, este aumento podría reflejar que el péptido A β está siendo degradado por los lisosomas y que la fusión ineficiente de las vesículas autofágicas con los lisosomas y, como consecuencia, la degradación autofágica ineficiente que tiene lugar en las células infectadas favorezca que no se eliminen los acúmulos de A β .

Existen evidencias que demuestran que el péptido A β se genera intracelularmente a través de la vía secretora, tanto en el RE (Cook y cols., 1997; Wild-Bode y cols., 1997) como en la red del Golgi (Hartmann y cols., 1997). Además, la producción de A β en la ruta secretora es exclusiva de neuronas ya que en células no neuronales el péptido A β es generado en mayor medida en la superficie celular y no intracelularmente (Hartmann y cols., 1997). Debido a que los compartimentos autofágicos y lisosomales no están implicados funcionalmente en la generación del péptido A β que posteriormente se acumula como consecuencia de la infección, es posible que el péptido A β se produzca en la vía secretora en nuestros modelos celulares. La cuantificación de A β en medios condicionados de células infectadas revelaron que HSV-1 induce una disminución muy elevada de los niveles de las dos isoformas del péptido A β secretado en las células SK-APP. La mayor parte del péptido A β sintetizado en la célula es destinado a la secreción y ésta tiene lugar mayoritariamente a través de la ruta secretora constitutiva (Busciglio y cols., 1993). En base a esto, la disminución de los niveles del péptido A β extracelular y, en consecuencia, el incremento del péptido A β intracelular en las células infectadas, podría ser debido a una inhibición de la ruta secretora constitutiva inducida por la infección con HSV-1, lo que provocaría una acumulación progresiva del péptido A β dentro de la célula a lo largo de la infección. Ensayos de actividad de la vía secretora constitutiva, utilizando una luciferasa de *Gaussia* (GLuc) que se secreta constitutivamente, demostraron que HSV-1 no sólo no ejerce una inhibición sino que induce un aumento de la actividad secretora de una forma dependiente de tiempo y de dosis viral. Este resultado, sugiere que, mayoritariamente, en nuestro modelo celular la secreción del péptido A β no tiene lugar por la vía secretora constitutiva.

Se han descrito varias vías de secreción alternativas a la vía convencional (Nickel and Rabouille, 2009). Una de ellas implica la secreción de exosomas derivados de los MVB. Los MVB son una clase de endosomas tardíos que presentan invaginaciones de la membrana que dan lugar a vesículas internas denominadas exosomas (van der Goot and Gruenberg, 2006). Principalmente, los MVB envían sus contenidos citoplasmáticos a los lisosomas para su degradación (Piper and Katzmann, 2007) pero también se fusionan con la membrana plasmática liberando los exosomas al espacio extracelular (Stoorvogel y cols., 2002; Fevrier and Raposo, 2004). Recientemente, se ha descrito que el péptido A β es liberado al espacio extracelular mediante la secreción de exosomas (Rajendran y cols., 2006). En este sentido, la colocalización de CD222 y el péptido A β inducida por HSV-1 puede indicar una implicación funcional de la vía endocítica en la secreción del péptido al exterior celular. También se ha descrito recientemente que la inducción de la autofagia redirige los MVBs hacia las vesículas autofágicas lo que deriva en la inhibición de la secreción de los exosomas (Fader y cols., 2008). Así, un escenario posible en nuestro modelo celular de infección es que la inhibición de la ruta de secreción mediada por

exosomas en las células infectadas por HSV-1 se traduciría en una acumulación del péptido A β . Debido a que la maquinaria autofágica es la encargada de la eliminación de agregados proteicos celulares, ésta se dispararía como consecuencia de la acumulación del péptido A β pero es posteriormente inhibida en sus etapas finales por HSV-1 resultando en el mal funcionamiento de la vía autofágica por una deficiencia en la fusión con los lisosomas y, por tanto, causando la acumulación de las estructuras LC3/A β positivas.

La generación del péptido A β también tiene lugar en el sistema endosomal (Koo and Squazzo, 1994; Kinoshita y cols., 2003). Los endosomas tardíos/MVB se pueden fusionar directamente con los lisosomas o previamente con los autofagosomas generando los anfisomas que, finalmente, también se fusionan con los lisosomas (Berg y cols., 1998; Liou y cols., 1997). En las neuronas, existe una fusión activa entre los endosomas y los autofagosomas (Larsen and Sulzer, 2002), lo que indica que la endocitosis podría ser una vía importante de entrada del APP en la vía autofágica. Los MVB y los endosomas son relativamente abundantes en APP y las distintas secretasas, y se ha descrito que ambas estructuras contienen el péptido A β en cerebros de pacientes con EA y modelos murinos de EA (Gouras y cols., 2000; Takahashi y cols., 2002). En este sentido, el marcador de autofagia LC3 y el marcador de endosomas tardíos CD222 colocalizan en células infectadas con HSV-1, pero estas estructuras no contienen el marcador de endosomas tempranos EEA1, lo que sugiere que en nuestro modelo celular están teniendo lugar eventos de fusión entre los endosomas tardíos/MVB y los autofagosomas. El acúmulo de estructuras LC3/A β y CD222 positivas podría explicarse en base a una degradación lisosomal ineficiente y, consecuentemente, una acumulación de anfisomas que podría contribuir a la acumulación del péptido A β intracelular en las células infectadas con HSV-1. Recientemente, se ha descrito que la degradación de proteínas por la vía autofágica requiere la presencia de MVBs funcionales. En estas condiciones se detectan anfisomas pero la formación de los autolisosomas está inhibida (Filimonenko y cols., 2007). Teniendo en cuenta este dato, otra posibilidad es que en las células infectadas con HSV-1, existan MVB no funcionales que inhiban la degradación autofágica. Otros resultados a favor de esta hipótesis provienen de un estudio en un modelo de la enfermedad de Niemann-Pick, donde una deficiencia de una proteína endosomal genera un desorden con marcas histopatológicas comunes con la EA, incluyendo ovillos neurofibrilares, la acumulación de A β (Yamazaki y cols., 2001) y la aparición de fragmentos proteolíticos procedentes del APP en endosomas (Jin y cols., 2004).

El conocimiento del origen del péptido A β acumulado como consecuencia de la infección con HSV-1 es de gran importancia para comprender los mecanismos moleculares del proceso. Actualmente, estamos investigando si el péptido A β localizado en estructuras autofágicas se origina a través de la ruta secretora o en el compartimento endosomal, mediante la utilización

de drogas inhibitoras de ambas rutas y la inhibición de la expresión de proteínas esenciales en ambos procesos por RNA de interferencia. Un escenario alternativo en nuestro modelo celular de infección es que la acumulación del péptido A β inducida por HSV-1 sea la causa directa del incremento del número de vesículas autofágicas en vez de que el proceso autofágico constituya una respuesta celular inducida para la eliminación del péptido A β . Esta hipótesis está en conformidad con la aparición más temprana del péptido A β intracelular, detectable a 2 h.p.i., con respecto a las vesículas LC3 positivas detectables a 6 h.p.i. En este sentido, se ha demostrado la activación del proceso autofágico inducida por el péptido A β (Hung y cols., 2009) y un trabajo reciente describe que el péptido A β 42 inicia una cascada neurodegenerativa al inducir una acumulación masiva de vesículas autofágicas en un modelo de *Drosophila* (Ling and Salvaterra, 2009; Ling y cols., 2009). La utilización de RNA interferentes específicos de APP sería de una gran utilidad para el estudio de esta hipótesis.

Un aspecto a destacar es que las alteraciones en el metabolismo de la proteína APP y en el proceso autofágico también se observan cuando la infección con HSV-1 se realiza en condiciones más similares a la infección natural, es decir, a una *moi* baja y durante tiempos más largos. Este hecho excluye la posibilidad de que, tanto la acumulación del péptido A β como la de los autofagosomas inducidas por el virus, fueran el resultado de una sobrecarga excesiva de los mecanismos celulares que median tanto el metabolismo de APP como el proceso autofágico producto de una infección masiva. Además, estas alteraciones son específicas de la infección con HSV-1 y no un fenómeno general asociado a la infección viral, ya que experimentos de infección con un virus Sindbis recombinante que expresa la proteína GFP o con adenovirus no replicativos que expresan shRNA no indujeron la acumulación de A β ni de vesículas autofágicas. En este sentido, se ha descrito que el HIV-1 induce la acumulación de A β intraneuronal en pacientes infectados con HIV-1 (Achim y cols., 2009). Es posible que la infección con distintos virus asociados con el desarrollo de alteraciones neurológicas, como el HSV-1 y el HIV-1, esté asociada a la producción de A β y que éste sea uno de los mecanismos que contribuyan a la muerte neuronal.

La hipótesis de los eventos celulares que podrían conducir a la acumulación del péptido A β intracelular en las vesículas autofágicas en las células neuronales infectadas con HSV-1 está resumida en la Figura D.1:

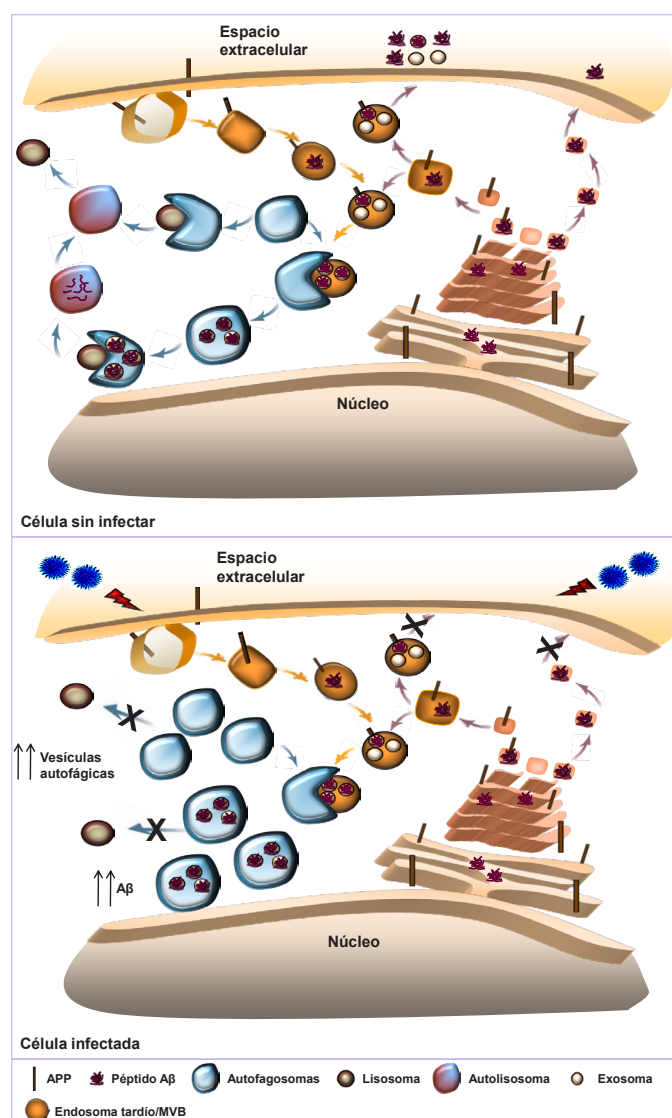


Figura D.1. Hipótesis de los eventos celulares inducidos por la infección con HSV-1. En células sin infectar, el péptido A β se puede generar en el RE y en el aparato de Golgi y ser secretado a través de la vía secretora constitutiva. Sin embargo, la mayor parte del péptido A β se secretaría a través de la liberación de los exosomas de los MVBs. El APP localizado en la membrana plasmática puede ser internalizado por endocitosis y ser procesado proteolíticamente por las actividades β - y γ -secretasa en el sistema endosomal/lisosomal dando lugar al péptido A β . Además, la proteína APP residente en el aparato de Golgi y el péptido A β generado en la ruta secretora también pueden ser introducidos en la vía endosomal. Los endosomas conteniendo APP y A β maduran en MVBs que, en las células sin infectar, predominantemente se fusionarían con la membrana plasmática liberando el péptido A β al espacio extracelular. Sin embargo, en células infectadas con HSV-1, los endosomas/MVBs serían redirigidos a la vía autofágica causando la inhibición de la secreción del péptido A β . Como HSV-1 también inhibe los eventos de fusión autofagosomas-lisosomas y, por tanto, la ejecución de la autofagia, se produciría el aumento del número de vesículas autofágicas, algunas de las cuáles acumularían el péptido A β en células infectadas.

6.4. INTERACCIÓN ENTRE EL HSV-1 Y EL ESTRÉS OXIDATIVO.

El estrés oxidativo asociado al envejecimiento es un factor importante en el desarrollo de la EA y uno de los eventos primarios en la patogénesis de la misma (Nunomura y cols., 2001). Los cerebros de pacientes de EA presentan evidencias de daño neuronal mediado por especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Pratico, 2002), detectándose un daño oxidativo neuronal incluso en los estadios tempranos de la EA (Zhu y cols., 2004). Además, en células de neuroblastoma humano se ha descrito que el estrés oxidativo induce la acumulación de A β intracelular a través de la inducción de un proceso autofágico (Zheng y cols., 2006). Por otra parte, el estrés oxidativo es un evento común asociado a las infecciones virales. Está ampliamente descrito que tanto la infección aguda como la infección latente de HSV-1 induce la aparición de daño oxidativo en el sistema nervioso (Milatovic y cols., 2002; Valyi-Nagy y cols., 2000). Estudios en modelos de infección latente con HSV-1 han revelado una inflamación crónica, con un elevado nivel de citoquinas y un incremento en la actividad de iNOS, ambiente que puede prevenir la reactivación de HSV-1 y, a su vez, causar un daño oxidativo neuronal (Koprowski y cols., 1993; Meyding-Lamade y cols., 1998). Teniendo en cuenta estos antecedentes, se analizó el efecto del estrés oxidativo sobre los marcadores de neurodegeneración inducidos por la infección con HSV-1. Para ello, se empleó el sistema generador de radicales libres XXO con el que tenemos una amplia experiencia en nuestro laboratorio. Así, trabajos previos de nuestro grupo en la línea celular de neuroblastoma humano SK-N-MC han mostrado que el tratamiento con XXO induce una muerte celular apoptótica y una potente regulación de la vía biosintética del colesterol (Recuero y cols., 2009). Las anomalías en el metabolismo del colesterol son muy importantes en la patogénesis de la EA. Además, los niveles de colesterol en la membrana celular afectan el procesamiento proteolítico de la proteína APP, incrementando los niveles del péptido A β (Martins y cols., 2009). Los resultados revelan que el estrés oxidativo induce la acumulación de vesículas autofágicas e inhibe la secreción del péptido A β , aunque en menores niveles que la infección con HSV-1. Al analizar la interacción entre los dos factores, se observa que el estrés oxidativo exacerba los efectos producidos por la infección con HSV-1, incrementando tanto la acumulación del péptido A β intracelular como de las vesículas autofágicas. Además, también contribuye a la inhibición de la secreción del péptido A β . Debido a que el estrés oxidativo actúa como un potenciador de los efectos de la infección con HSV-1, se analizó si el efecto del estrés oxidativo era debido meramente a un aumento de la eficiencia de la infección. Sorprendentemente, el estrés oxidativo atenuó en gran medida la infección con HSV-1. Estos resultados están en conformidad con el hecho de que las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS) modulan la permisividad de las células en la replicación viral como parte de la respuesta inmune de la células huésped (Akaike,

2001). Además, se ha demostrado el efecto antiviral del óxido nítrico mediando la inhibición de la replicación de HSV-1 (Croen, 1993). Aunque no se han identificado los mecanismos responsables, el hecho de que el estrés oxidativo disminuya la eficiencia de la infección y, sin embargo, aumente los efectos patológicos inducidos por HSV-1, podría ser debido a la inducción de una infección más controlada por parte del estrés oxidativo. Como se ha discutido anteriormente, la acumulación de vesículas autofágicas y de A β intracelular no es dependiente de la existencia de una infección productiva. En este sentido, la reducción de partículas virales infectivas causada por el estrés oxidativo retrasaría la lisis celular producida por el virus y, en consecuencia, se mantendrían los efectos negativos de la infección en la célula huésped durante más tiempo. Traducido a la situación *in vivo*, el estrés oxidativo asociado al envejecimiento, generaría en el cerebro un ambiente favorable para que la infección con HSV-1 afectara más profundamente a la acumulación de A β y a la funcionalidad del proceso autofágico, pudiendo contribuir de esta forma al desarrollo de la patogénesis de la EA. Estos resultados abren la posibilidad de una interacción entre el estrés oxidativo asociado al envejecimiento y la infección con HSV-1 y su posible participación en procesos de neurodegeneración.

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo indican que HSV-1 induce una respuesta autofágica incompleta en células neuronales humanas. Existe un número creciente de evidencias que sugieren que la acumulación de autofagosomas, producto de una autofagia no funcional, contribuyen a la disfunción neuronal. De esta forma, la alteración del proceso autofágico inducido por HSV-1 podría, por tanto, participar en el desarrollo de procesos neurodegenerativos asociados a la infección. Además, HSV-1 también induce la acumulación del péptido A β en las vesículas autofágicas inducidas por la infección con HSV-1. Esta acumulación podría ser causada por el aumento de la actividad de la γ -secretasa, la inhibición de la secreción del péptido A β y el fallo en la degradación autofágica del mismo, probablemente debido a un defecto en la fusión de las vesículas autofágicas y los lisosomas. Evidencias procedentes de nuestro trabajo y de otros estudios muestran que la infección con HSV-1 es capaz de reproducir los aspectos patológicos más importantes relacionados con la neurodegeneración característica de la EA: la hiperfosforilación de tau, el incremento de los niveles del péptido A β intracelular y una masiva acumulación de autofagosomas como consecuencia de una alteración en la ejecución del proceso autofágico. Finalmente, HSV-1 interacciona con el estrés oxidativo, otro factor asociado al envejecimiento, potenciando estos procesos patológicos. Todos estos resultados convierten a HSV-1 en un posible agente causal de la EA esporádica.

CONCLUSIONES

El trabajo experimental realizado en esta tesis ha permitido obtener las siguientes conclusiones:

1. La infección con HSV-1 induce la acumulación de la especie asociada a autofagia de LC3, LC3-II, y su movilización a vesículas autofágicas de una forma dependiente del tiempo y dosis viral. Estos efectos son específicos de la infección ya que son revertidos por el inhibidor de la entrada viral heparina. Sin embargo la acumulación de vesículas autofágicas es independiente de la replicación de HSV-1 y, por tanto, no es necesaria una infección productiva aunque si requiere la síntesis de proteínas virales.

2. Los datos obtenidos a partir del análisis del flujo autofágico en células infectadas indican que HSV-1 causa un fallo en la fusión de los autofagosomas con los lisosomas que son el orgánulo destino de la vía autofágica. De esta forma, la acumulación masiva de autofagosomas inducida por la infección con HSV-1 no es producto de una activación de la autofagia sino de una inhibición del flujo autofágico.

3. La infección con HSV-1 afecta profundamente al metabolismo de la proteína APP. HSV-1 induce la acumulación intracelular de las dos isoformas principales del péptido A β , la inhibición de la secreción de A β y la disminución de los niveles de los fragmentos proteolíticos α -CTF y sAPP α resultantes del procesamiento no amiloidogénico de la proteína APP. Además HSV-1 inhibe significativamente la actividad de la enzima α -secretasa. Todos estos datos indican que HSV-1 favorece la actividad de la vía de procesamiento amiloidogénico de APP.

4. La acumulación intracelular del péptido A β es un efecto específico de la infección ya que es revertida por el inhibidor de la entrada viral heparina. Además, la acumulación de A β requiere la síntesis de proteínas virales pero no una infección productiva.

5. La infección con HSV-1 afecta de forma diferencial a las dos enzimas responsables de la generación del péptido A β induciendo un aumento de la actividad γ -secretasa sin modificar la actividad β -secretasa. El aumento de la actividad γ -secretasa unido a la inhibición de la secreción del péptido A β y al fallo en su eliminación causado por el bloqueo de la degradación autofágica inducidos por la infección, podrían ser los mecanismos implicados en la acumulación de A β intracelular provocada por HSV-1.

6. La colocalización del péptido A β , LC3-II y p62 en la misma estructura subcelular indica que A β se está acumulando en compartimentos autofágicos en células infectadas con HSV-1. Aunque se ha descrito que la autofagia es una vía implicada en la generación de A β , los resultados obtenidos con inhibidores de autofagia y de la función lisosomal descartan esta posibilidad. El

péptido A β podría ser señalizado para su degradación por la vía autofágica resultando en su acumulación como consecuencia de la inhibición de la ejecución de la autofagia causada por el virus.

7. El estrés oxidativo inducido por el sistema generador de radicales libres xantina-xantina oxidasa afecta profundamente a los efectos producidos por la infección con HSV-1. Por una parte, disminuye fuertemente la eficiencia de infección por HSV-1 pero por otra, presenta un efecto aditivo con la infección causando una mayor acumulación de autofagosomas y de A β intracelular así como una mayor inhibición de la secreción de A β , sugiriendo un papel de la interacción entre estos dos factores en la aparición de los signos de neurodegeneración característica de la EA.

Conclusión final

Utilizando diferentes modelos celulares neuronales, HSV-1 es capaz de modificar profundamente distintos aspectos relacionados con la neurodegeneración y, en concreto, con la enfermedad de Alzheimer: i) HSV-1 induce una masiva acumulación de autofagosomas como consecuencia de un fallo en la ejecución del proceso autofágico ii) HSV-1 causa un aumento significativo de los niveles del péptido A β intracelular que se localiza en los compartimentos autofágicos así como una inhibición de la vía de procesamiento no amiloidogénico del APP y iii) HSV-1 interacciona con el EO, otro factor asociado al envejecimiento y a enfermedades neurodegenerativas, exacerbando estos procesos. Todos estos efectos producidos por la infección se relacionan con alteraciones características de los cerebros de enfermos de Alzheimer y otros procesos neurodegenerativos. Estas evidencias, unidas a las de otros autores, señalan al HSV-1 como un posible agente causal de la enfermedad de Alzheimer.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA.

Achim, C. L., Adame, A., Dumaop, W., Everall, I. P. and Masliah, E. (2009). Increased accumulation of intraneuronal amyloid beta in HIV-infected patients. *J Neuroimmune Pharmacol* **4**, 190-9.

Akaike, T. (2001). Role of free radicals in viral pathogenesis and mutation. *Rev Med Virol* **11**, 87-101.

Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G. M., Cooper, N. R., Eikelenboom, P., Emmerling, M., Fiebich, B. L., Finch, C. E., Frautschy, S., Griffin, W. S., Hampel, H., Hull, M., Landreth, G., Lue, L., Mrak, R., Mackenzie, I. R., McGeer, P. L., O'Banion, M. K., Pachter, J., Pasinetti, G., Plata-Salaman, C., Rogers, J., Rydel, R., Shen, Y., Streit, W., Strohmeyer, R., Tooyoma, I., Van Muiswinkel, F. L., Veerhuis, R., Walker, D., Webster, S., Wegrzyniak, B., Wenk, G. and Wyss-Coray, T. (2000). Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **21**, 383-421.

Alexander, D. E., Ward, S. L., Mizushima, N., Levine, B. and Leib, D. A. (2007). Analysis of the role of autophagy in replication of herpes simplex virus in cell culture. *J Virol* **81**, 12128-34.

Almeida, C. G., Takahashi, R. H. and Gouras, G. K. (2006). Beta-amyloid accumulation impairs multivesicular body sorting by inhibiting the ubiquitin-proteasome system. *J Neurosci* **26**, 4277-88.

Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde. *Allg Z Psychiat Psych Gericht Med* **64**, 146-148.

Allinson, T. M., Parkin, E. T., Turner, A. J. and Hooper, N. M. (2003). ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J Neurosci Res* **74**, 342-52.

Amaducci, L. and Tesco, G. (1994). Aging as a major risk for degenerative diseases of the central nervous system. *Curr Opin Neurol* **7**, 283-6.

Andersen, J. K. (2004). Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med* **10 Suppl**, S18-25.

Asai, M., Hattori, C., Szabo, B., Sasagawa, N., Maruyama, K., Tanuma, S. and Ishiura, S. (2003). Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase. *Biochem Biophys Res Commun* **301**, 231-5.

Badr, C. E., Hewett, J. W., Breakefield, X. O. and Tannous, B. A. (2007). A highly sensitive assay for monitoring the secretory pathway and ER stress. *PLoS One* **2**, e571.

Balin, B. J., Gerard, H. C., Arking, E. J., Appelt, D. M., Branigan, P. J., Abrams, J. T., Whittum-Hudson, J. A. and Hudson, A. P. (1998). Identification and localization of Chlamydia pneumoniae in the Alzheimer's brain. *Med Microbiol Immunol* **187**, 23-42.

Ball, M. J. (1982). "Limbic predilection in Alzheimer dementia: is reactivated herpesvirus involved?". *Can J Neurol Sci* **9**, 303-6.

Ball, M. J. (1986). Herpesvirus in the hippocampus as a cause of Alzheimer's disease. *Arch Neurol* **43**, 313.

Baringer, J. R. and Pisani, P. (1994). Herpes simplex virus genomes in human nervous system tissue analyzed by polymerase chain reaction. *Ann Neurol* **36**, 823-9.

Behl, C., Davis, J. B., Lesley, R. and Schubert, D. (1994). Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* **77**, 817-27.

Benboudjema, L., Mulvey, M., Gao, Y., Pimplikar, S. W. and Mohr, I. (2003). Association of the herpes simplex virus type 1 Us11 gene product with the cellular kinesin light-chain-related protein PAT1 results in the redistribution of both polypeptides. *J Virol* **77**, 9192-203.

Benzing, W. C., Mufson, E. J. and Armstrong, D. M. (1993). Alzheimer's disease-like dystrophic neurites characteristically associated with senile plaques are not found within other neurodegenerative diseases unless amyloid beta-protein deposition is present. *Brain Res* **606**, 10-8.

Berg, T. O., Fengsrud, M., Stromhaug, P. E., Berg, T. and Seglen, P. O. (1998). Isolation and characterization of rat liver amphisomes. Evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes. *J Biol Chem* **273**, 21883-92.

Billings, L. M., Oddo, S., Green, K. N., McGaugh, J. L. and LaFerla, F. M. (2005). Intraneuronal Aβ causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron* **45**, 675-88.

Bjorkoy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Overvatn, A., Stenmark, H. and Johansen, T. (2005). p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol* **171**, 603-14.

Bjorkoy, G., Lamark, T., Pankiv, S., Overvatn, A., Brech, A. and Johansen, T. (2009). Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol* **452**, 181-97.

- Blennow, K., de Leon, M. J. and Zetterberg, H.** (2006). Alzheimer's disease. *Lancet* **368**, 387-403.
- Boggian, I., Buzzacaro, E., Calistri, A., Calvi, P., Cavaggioni, A., Mucignat-Caretta, C. and Palu, G.** (2000). Asymptomatic herpes simplex type 1 virus infection of the mouse brain. *J Neurovirol* **6**, 303-13.
- Boland, B., Kumar, A., Lee, S., Platt, F. M., Wegiel, J., Yu, W. H. and Nixon, R. A.** (2008). Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease. *J Neurosci* **28**, 6926-37.
- Boland, B. and Nixon, R. A.** (2006). Neuronal macroautophagy: from development to degeneration. *Mol Aspects Med* **27**, 503-19.
- Breteler, M. M.** (2000). Vascular risk factors for Alzheimer's disease: an epidemiologic perspective. *Neurobiol Aging* **21**, 153-60.
- Bu, G., Cam, J. and Zerbinatti, C.** (2006). LRP in amyloid-beta production and metabolism. *Ann N Y Acad Sci* **1086**, 35-53.
- Burgos, J. S., Ramirez, C., Sastre, I., Bullido, M. J. and Valdivieso, F.** (2002). Involvement of apolipoprotein E in the hematogenous route of herpes simplex virus type 1 to the central nervous system. *J Virol* **76**, 12394-8.
- Burgos, J. S., Ramirez, C., Sastre, I., Bullido, M. J. and Valdivieso, F.** (2003). ApoE4 is more efficient than E3 in brain access by herpes simplex virus type 1. *Neuroreport* **14**, 1825-7.
- Burgos, J. S., Ramirez, C., Sastre, I. and Valdivieso, F.** (2006). Effect of apolipoprotein E on the cerebral load of latent herpes simplex virus type 1 DNA. *J Virol* **80**, 5383-7.
- Busciglio, J., Gabuzda, D. H., Matsudaira, P. and Yankner, B. A.** (1993). Generation of beta-amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2092-6.
- Cam, J. A., Zerbinatti, C. V., Knisely, J. M., Hecimovic, S., Li, Y. and Bu, G.** (2004). The low density lipoprotein receptor-related protein 1B retains beta-amyloid precursor protein at the cell surface and reduces amyloid-beta peptide production. *J Biol Chem* **279**, 29639-46.
- Capell, A., Steiner, H., Romig, H., Keck, S., Baader, M., Grim, M. G., Baumeister, R. and Haass, C.** (2000). Presenilin-1 differentially facilitates endoproteolysis of the beta-amyloid precursor protein and Notch. *Nat Cell Biol* **2**, 205-11.

- Cappai, R. and Barnham, K. J.** (2008). Delineating the mechanism of Alzheimer's disease A beta peptide neurotoxicity. *Neurochem Res* **33**, 526-32.
- Carballal, E. S.** (2003). Sobre el papel patogénico del péptido beta amiloide en la enfermedad de Alzheimer. In *Biología Molecular*. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid.
- Carrascosa, A. L., Santaren, J. F. and Vinuela, E.** (1982). Production and titration of African swine fever virus in porcine alveolar macrophages. *J Virol Methods* **3**, 303-10.
- Caspersen, C., Wang, N., Yao, J., Sosunov, A., Chen, X., Lustbader, J. W., Xu, H. W., Stern, D., McKhann, G. and Yan, S. D.** (2005). Mitochondrial Abeta: a potential focal point for neuronal metabolic dysfunction in Alzheimer's disease. *FASEB J* **19**, 2040-1.
- Cataldo, A. M., Barnett, J. L., Berman, S. A., Li, J., Quarless, S., Bursztajn, S., Lippa, C. and Nixon, R. A.** (1995). Gene expression and cellular content of cathepsin D in Alzheimer's disease brain: evidence for early up-regulation of the endosomal-lysosomal system. *Neuron* **14**, 671-80.
- Cataldo, A. M., Thayer, C. Y., Bird, E. D., Wheelock, T. R. and Nixon, R. A.** (1990). Lysosomal proteinase antigens are prominently localized within senile plaques of Alzheimer's disease: evidence for a neuronal origin. *Brain Res* **513**, 181-92.
- Cleobury, J. F., Skinner, G. R., Thouless, M. E. and Wildy, P.** (1971). Association between psychopathic disorder and serum antibody to herpes simplex virus (type 1). *Br Med J* **1**, 438-9.
- Codogno, A. J. M. P.** (2004). Signaling pathways in mammalian autophagy. In *Autophagy*, (ed. D. J. Klionsky), pp. 26-47. Georgetown: Eureka.com/Landes Bioscience.
- Colton, C. A. and Gilbert, D. L.** (1987). Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia. *FEBS Lett* **223**, 284-8.
- Cook, D. G., Forman, M. S., Sung, J. C., Leight, S., Kolson, D. L., Iwatsubo, T., Lee, V. M. and Doms, R. W.** (1997). Alzheimer's A beta(1-42) is generated in the endoplasmic reticulum/intermediate compartment of NT2N cells. *Nat Med* **3**, 1021-3.
- Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., Roses, A. D., Haines, J. L. and Pericak-Vance, M. A.** (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* **261**, 921-3.
- Cras, P., Kawai, M., Siedlak, S., Mulvihill, P., Gambetti, P., Lowery, D., Gonzalez-DeWhitt, P., Greenberg, B. and Perry, G.** (1990). Neuronal and microglial involvement in beta-amyloid protein deposition in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* **137**, 241-6.

Cribbs, D. H., Azizeh, B. Y., Cotman, C. W. and LaFerla, F. M. (2000). Fibril formation and neurotoxicity by a herpes simplex virus glycoprotein B fragment with homology to the Alzheimer's A beta peptide. *Biochemistry* **39**, 5988-94.

Croen, K. D. (1993). Evidence for antiviral effect of nitric oxide. Inhibition of herpes simplex virus type 1 replication. *J Clin Invest* **91**, 2446-52.

Cuervo, A. M., Stefanis, L., Fredenburg, R., Lansbury, P. T. and Sulzer, D. (2004). Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science* **305**, 1292-5.

Chou, J., Chen, J. J., Gross, M. and Roizman, B. (1995). Association of a M(r) 90,000 phosphoprotein with protein kinase PKR in cells exhibiting enhanced phosphorylation of translation initiation factor eIF-2 alpha and premature shutoff of protein synthesis after infection with gamma 134.5- mutants of herpes simplex virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10516-20.

Davis, R. E., Miller, S., Herrnsstadt, C., Ghosh, S. S., Fahy, E., Shinobu, L. A., Galasko, D., Thal, L. J., Beal, M. F., Howell, N. and Parker, W. D., Jr. (1997). Mutations in mitochondrial cytochrome c oxidase genes segregate with late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4526-31.

De Strooper, B. and Annaert, W. (2000). Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Sci* **113** (Pt 11), 1857-70.

Deane, R., Du Yan, S., Subramanyam, R. K., LaRue, B., Jovanovic, S., Hogg, E., Welch, D., Manness, L., Lin, C., Yu, J., Zhu, H., Ghiso, J., Frangione, B., Stern, A., Schmidt, A. M., Armstrong, D. L., Arnold, B., Liliensiek, B., Nawroth, P., Hofman, F., Kindy, M., Stern, D. and Zlokovic, B. (2003). RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat Med* **9**, 907-13.

Diefenbach, R. J., Miranda-Saksena, M., Diefenbach, E., Holland, D. J., Boadle, R. A., Armati, P. J. and Cunningham, A. L. (2002). Herpes simplex virus tegument protein US11 interacts with conventional kinesin heavy chain. *J Virol* **76**, 3282-91.

Dobson, C. B., Wozniak, M. A. and Itzhaki, R. F. (2003). Do infectious agents play a role in dementia? *Trends Microbiol* **11**, 312-7.

Dunn, W. A., Jr. (1994). Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. *Trends Cell Biol* **4**, 139-43.

Eckman, E. A., Reed, D. K. and Eckman, C. B. (2001). Degradation of the Alzheimer's amyloid beta peptide by endothelin-converting enzyme. *J Biol Chem* **276**, 24540-8.

- Eckman, E. A., Watson, M., Marlow, L., Sambamurti, K. and Eckman, C. B.** (2003). Alzheimer's disease beta-amyloid peptide is increased in mice deficient in endothelin-converting enzyme. *J Biol Chem* **278**, 2081-4.
- English, L., Chemali, M., Duron, J., Rondeau, C., Laplante, A., Gingras, D., Alexander, D., Leib, D., Norbury, C., Lippe, R. and Desjardins, M.** (2009). Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection. *Nat Immunol* **10**, 480-7.
- Eskelinen, E. L.** (2005). Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells. *Autophagy* **1**, 1-10.
- Espert, L., Codogno, P. and Biard-Piechaczyk, M.** (2007). Involvement of autophagy in viral infections: antiviral function and subversion by viruses. *J Mol Med* **85**, 811-23.
- Evans, D. A., Funkenstein, H. H., Albert, M. S., Scherr, P. A., Cook, N. R., Chown, M. J., Hebert, L. E., Hennekens, C. H. and Taylor, J. O.** (1989). Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported. *JAMA* **262**, 2551-6.
- Fader, C. M., Sanchez, D., Furlan, M. and Colombo, M. I.** (2008). Induction of autophagy promotes fusion of multivesicular bodies with autophagic vacuoles in k562 cells. *Traffic* **9**, 230-50.
- Farzan, M., Schnitzler, C. E., Vasilieva, N., Leung, D. and Choe, H.** (2000). BACE2, a beta -secretase homolog, cleaves at the beta site and within the amyloid-beta region of the amyloid-beta precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9712-7.
- Fengsrud, M., Erichsen, E. S., Berg, T. O., Raiborg, C. and Seglen, P. O.** (2000). Ultrastructural characterization of the delimiting membranes of isolated autophagosomes and amphisomes by freeze-fracture electron microscopy. *Eur J Cell Biol* **79**, 871-82.
- Ferri, C. P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., Hall, K., Hasegawa, K., Hendrie, H., Huang, Y., Jorm, A., Mathers, C., Menezes, P. R., Rimmer, E. and Scazufca, M.** (2005). Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* **366**, 2112-7.
- Fevrier, B. and Raposo, G.** (2004). Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 415-21.
- Filimonenko, M., Stuffers, S., Raiborg, C., Yamamoto, A., Malerod, L., Fisher, E. M., Isaacs, A., Brech, A., Stenmark, H. and Simonsen, A.** (2007). Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease. *J Cell Biol* **179**, 485-500.

Fischer, P., Lassmann, H., Jellinger, K., Simanyi, M., Bancher, C., Travnicek-Marterer, A., Gatterer, G. and Danielczyk, W. (1991). [Alzheimer dementia. A clinical long-term study with quantitative neuropathology]. *Wien Med Wochenschr* **141**, 455-62.

Florez-McClure, M. L., Hohsfield, L. A., Fonte, G., Bealor, M. T. and Link, C. D. (2007). Decreased insulin-receptor signaling promotes the autophagic degradation of beta-amyloid peptide in *C. elegans*. *Autophagy* **3**, 569-80.

Fukuda, M. and Itoh, T. (2008). Direct link between Atg protein and small GTPase Rab: Atg16L functions as a potential Rab33 effector in mammals. *Autophagy* **4**, 824-6.

Gandy, S. (2005). The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease. *J Clin Invest* **115**, 1121-9.

Gandy, S., Caporaso, G., Buxbaum, J., Frangione, B. and Greengard, P. (1994). APP processing, A beta-amyloidogenesis, and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **15**, 253-6.

Gannage, M., Dormann, D., Albrecht, R., Dengjel, J., Torossi, T., Ramer, P. C., Lee, M., Strowig, T., Arrey, F., Conenello, G., Pypaert, M., Andersen, J., Garcia-Sastre, A. and Munz, C. (2009). Matrix protein 2 of influenza A virus blocks autophagosome fusion with lysosomes. *Cell Host Microbe* **6**, 367-80.

Gao, M. and Knipe, D. M. (1991). Potential role for herpes simplex virus ICP8 DNA replication protein in stimulation of late gene expression. *J Virol* **65**, 2666-75.

Garner, J. A. (2003). Herpes simplex virion entry into and intracellular transport within mammalian cells. *Adv Drug Deliv Rev* **55**, 1497-513.

Gelmini, S., Orlando, C., Sestini, R., Vona, G., Pinzani, P., Ruocco, L. and Pazzagli, M. (1997). Quantitative polymerase chain reaction-based homogeneous assay with fluorogenic probes to measure c-erbB-2 oncogene amplification. *Clin Chem* **43**, 752-8.

Geraghty, R. J., Krummenacher, C., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J. and Spear, P. G. (1998). Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. *Science* **280**, 1618-20.

Gerges, N. Z., Brown, T. C., Correia, S. S. and Esteban, J. A. (2005). Analysis of Rab protein function in neurotransmitter receptor trafficking at hippocampal synapses. *Methods Enzymol* **403**, 153-66.

Gibson, G. E., Sheu, K. F. and Blass, J. P. (1998). Abnormalities of mitochondrial enzymes in Alzheimer disease. *J Neural Transm* **105**, 855-70.

Glenner, G. G. and Wong, C. W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* **120**, 885-90.

Goate, A., Chartier-Harlin, M. C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L. and et al. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* **349**, 704-6.

Golde, T. E., Estus, S., Younkin, L. H., Selkoe, D. J. and Younkin, S. G. (1992). Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives. *Science* **255**, 728-30.

Good, P. F., Perl, D. P., Bierer, L. M. and Schmeidler, J. (1992). Selective accumulation of aluminum and iron in the neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: a laser microprobe (LAMMA) study. *Ann Neurol* **31**, 286-92.

Gordon, P. B. and Seglen, P. O. (1988). Prelysosomal convergence of autophagic and endocytic pathways. *Biochem Biophys Res Commun* **151**, 40-7.

Gouras, G. K., Tsai, J., Naslund, J., Vincent, B., Edgar, M., Checler, F., Greenfield, J. P., Haroutunian, V., Buxbaum, J. D., Xu, H., Greengard, P. and Relkin, N. R. (2000). Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain. *Am J Pathol* **156**, 15-20.

Graves, A. B., White, E., Koepsell, T. D., Reifler, B. V., van Belle, G., Larson, E. B. and Raskind, M. (1990). The association between head trauma and Alzheimer's disease. *Am J Epidemiol* **131**, 491-501.

Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., George, L., Tung, Y. C., Kim, K. S. and Wisniewski, H. M. (1989). Amyloid protein and neurofibrillary tangles coexist in the same neuron in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 2853-7.

Haarr, L. and Skulstad, S. (1994). The herpes simplex virus type 1 particle: structure and molecular functions. Review article. *Apmis* **102**, 321-46.

Haass, C. (2004). Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *EMBO J* **23**, 483-8.

Haass, C., Hung, A. Y., Schlossmacher, M. G., Oltersdorf, T., Teplow, D. B. and Selkoe, D. J. (1993). Normal cellular processing of the beta-amyloid precursor protein results in the secretion of the amyloid beta peptide and related molecules. *Ann N Y Acad Sci* **695**, 109-16.

Haass, C., Koo, E. H., Mellon, A., Hung, A. Y. and Selkoe, D. J. (1992a). Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature* **357**, 500-3.

Haass, C., Schlossmacher, M. G., Hung, A. Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B. L., Lieberburg, I., Koo, E. H., Schenk, D., Teplow, D. B. and et al. (1992b). Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* **359**, 322-5.

Halford, W. P., Gebhardt, B. M. and Carr, D. J. (1996). Mechanisms of herpes simplex virus type 1 reactivation. *J Virol* **70**, 5051-60.

Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H. and Mizushima, N. (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* **441**, 885-9.

Harborth, J., Elbashir, S. M., Bechert, K., Tuschl, T. and Weber, K. (2001). Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci* **114**, 4557-65.

Hardy, J. and Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297**, 353-6.

Hardy, W. R. and Sandri-Goldin, R. M. (1994). Herpes simplex virus inhibits host cell splicing, and regulatory protein ICP27 is required for this effect. *J Virol* **68**, 7790-9.

Harman, D. (1981). The aging process. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 7124-8.

Hartmann, T., Bieger, S. C., Bruhl, B., Tienari, P. J., Ida, N., Allsop, D., Roberts, G. W., Masters, C. L., Dotti, C. G., Unsicker, K. and Beyreuther, K. (1997). Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A beta40/42 amyloid peptides. *Nat Med* **3**, 1016-20.

Hayashi-Nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., Yoshimori, T. and Yamamoto, A. (2009). A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat Cell Biol* **11**, 1433-7.

He, B., Gross, M. and Roizman, B. (1997). The gamma(1)34.5 protein of herpes simplex virus 1 complexes with protein phosphatase 1alpha to dephosphorylate the alpha subunit of the eukaryotic translation initiation factor 2 and preclude the shutoff of protein synthesis by double-stranded RNA-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 843-8.

Herold, B. C., Visalli, R. J., Susmarski, N., Brandt, C. R. and Spear, P. G. (1994). Glycoprotein C-independent binding of herpes simplex virus to cells requires cell surface heparan sulphate and glycoprotein B. *J Gen Virol* **75** (Pt 6), 1211-22.

Herold, B. C., WuDunn, D., Soltys, N. and Spear, P. G. (1991). Glycoprotein C of herpes simplex virus type 1 plays a principal role in the adsorption of virus to cells and in infectivity. *J Virol* **65**, 1090-8.

Hill, A., Jugovic, P., York, I., Russ, G., Bennink, J., Yewdell, J., Ploegh, H. and Johnson, D. (1995). Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. *Nature* **375**, 411-5.

Holmes, C. and Cotterell, D. (2009). Role of infection in the pathogenesis of Alzheimer's disease: implications for treatment. *CNS Drugs* **23**, 993-1002.

Honess, R. W. and Roizman, B. (1974). Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J Virol* **14**, 8-19.

Honjo, K., van Reekum, R. and Verhoeff, N. P. (2009). Alzheimer's disease and infection: do infectious agents contribute to progression of Alzheimer's disease? *Alzheimers Dement* **5**, 348-60.

Huang, X., Atwood, C. S., Hartshorn, M. A., Multhaup, G., Goldstein, L. E., Scarpa, R. C., Cuajungco, M. P., Gray, D. N., Lim, J., Moir, R. D., Tanzi, R. E. and Bush, A. I. (1999). The A beta peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction. *Biochemistry* **38**, 7609-16.

Huber, G., Martin, J. R., Loffler, J. and Moreau, J. L. (1993). Involvement of amyloid precursor protein in memory formation in the rat: an indirect antibody approach. *Brain Res* **603**, 348-52.

Hung, S. Y., Huang, W. P., Liou, H. C. and Fu, W. M. (2009). Autophagy protects neuron from Abeta-induced cytotoxicity. *Autophagy* **5**, 502-10.

Itzhaki, R. F., Lin, W. R., Shang, D., Wilcock, G. K., Faragher, B. and Jamieson, G. A. (1997). Herpes simplex virus type 1 in brain and risk of Alzheimer's disease. *Lancet* **349**, 241-4.

Itzhaki, R. F., Wozniak, M., Dobson, C. and Lin, W. R. (1998). ApoE-viral interactions. *Nat Med* **4**, 1344.

Itzhaki, R. F. and Wozniak, M. A. (2008). Herpes simplex virus type 1 in Alzheimer's disease: the enemy within. *J Alzheimers Dis* **13**, 393-405.

- Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Watanabe, K., Sekiguchi, M., Hosoki, E., Kawashima-Morishima, M., Lee, H. J., Hama, E., Sekine-Aizawa, Y. and Saido, T. C.** (2000). Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat Med* **6**, 143-50.
- Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N. and Ihara, Y.** (1994). Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron* **13**, 45-53.
- Jackson, W. T., Giddings, T. H., Jr., Taylor, M. P., Mulinyawe, S., Rabinovitch, M., Kopito, R. R. and Kirkegaard, K.** (2005). Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. *PLoS Biol* **3**, e156.
- Jamieson, G. A., Maitland, N. J., Wilcock, G. K., Craske, J. and Itzhaki, R. F.** (1991). Latent herpes simplex virus type 1 in normal and Alzheimer's disease brains. *J Med Virol* **33**, 224-7.
- Jamieson, G. A., Maitland, N. J., Wilcock, G. K., Yates, C. M. and Itzhaki, R. F.** (1992). Herpes simplex virus type 1 DNA is present in specific regions of brain from aged people with and without senile dementia of the Alzheimer type. *J Pathol* **167**, 365-8.
- Jin, L. W., Shie, F. S., Maezawa, I., Vincent, I. and Bird, T.** (2004). Intracellular accumulation of amyloidogenic fragments of amyloid-beta precursor protein in neurons with Niemann-Pick type C defects is associated with endosomal abnormalities. *Am J Pathol* **164**, 975-85.
- Johnson, D. C. and Huber, M. T.** (2002). Directed egress of animal viruses promotes cell-to-cell spread. *J Virol* **76**, 1-8.
- Johnson, R. T.** (1998). Herpesvirus infection. In viral infections of the nervous system. Philadelphia.
- Jounai, N., Takeshita, F., Kobiyama, K., Sawano, A., Miyawaki, A., Xin, K. Q., Ishii, K. J., Kawai, T., Akira, S., Suzuki, K. and Okuda, K.** (2007). The Atg5 Atg12 conjugate associates with innate antiviral immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 14050-5.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T.** (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* **19**, 5720-8.
- Kammerman, E. M., Neumann, D. M., Ball, M. J., Lukiw, W. and Hill, J. M.** (2006). Senile plaques in Alzheimer's diseased brains: possible association of beta-amyloid with herpes simplex virus type 1 (HSV-1) L-particles. *Med Hypotheses* **66**, 294-9.

Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., Multhaup, G., Beyreuther, K. and Muller-Hill, B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* **325**, 733-6.

Kavouras, J. H., Prandovszky, E., Valyi-Nagy, K., Kovacs, S. K., Tiwari, V., Kovacs, M., Shukla, D. and Valyi-Nagy, T. (2007). Herpes simplex virus type 1 infection induces oxidative stress and the release of bioactive lipid peroxidation by-products in mouse P19N neural cell cultures. *J Neurovirol* **13**, 416-25.

Kimberly, W. T., LaVoie, M. J., Ostaszewski, B. L., Ye, W., Wolfe, M. S. and Selkoe, D. J. (2003). Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6382-7.

Kinoshita, A., Fukumoto, H., Shah, T., Whelan, C. M., Irizarry, M. C. and Hyman, B. T. (2003). Demonstration by FRET of BACE interaction with the amyloid precursor protein at the cell surface and in early endosomes. *J Cell Sci* **116**, 3339-46.

Kirkegaard, K., Taylor, M. P. and Jackson, W. T. (2004). Cellular autophagy: surrender, avoidance and subversion by microorganisms. *Nat Rev Microbiol* **2**, 301-14.

Kitaguchi, N., Takahashi, Y., Tokushima, Y., Shiojiri, S. and Ito, H. (1988). Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature* **331**, 530-2.

Klionsky, D. J., Abeliovich, H., Agostinis, P., Agrawal, D. K., Aliev, G., Askew, D. S., Baba, M., Baehrecke, E. H., Bahr, B. A., Ballabio, A., Bamber, B. A., Bassham, D. C., Bergamini, E. Bi, X., Biard-Piechaczyk, M., Blum, J. S., Bredesen, D. E., Brodsky, J. L., Brumell, J. H., Brunk, U. T., Bursch, W., Camougrand, N., Cebollero, E., Cecconi, F., Chen, Y., Chin, L. S., Choi, A., Chu, C. T., Chung, J., Clarke, P. G., Clark, R. S., Clarke, S. G., Clave, C., Cleveland, J. L., Codogno, P., Colombo, M. I., Coto-Montes, A., Cregg, J. M., Cuervo, A. M., Debnath, J., Demarchi, F., Dennis, P. B., Dennis, P. A., Deretic, V., Devenish, R. J., Di Sano, F., Dice, J. F., Difiglia, M., Dinesh-Kumar, S., Distelhorst, C. W., Djavaheri-Mergny, M., Dorsey, F. C., Droge, W., Dron, M., Dunn, W. A., Jr., Duszenko, M., Eissa, N. T., Elazar, Z., Esclatine, A., Eskelinen, E. L., Fesus, L., Finley, K. D., Fuentes, J. M., Fueyo, J., Fujisaki, K., Galliot, B., Gao, F. B., Gewirtz, D. A., Gibson, S. B., Gohla, A., Goldberg, A. L., Gonzalez, R., Gonzalez-Estevez, C., Gorski, S., Gottlieb, R. A., Haussinger, D., He, Y. W., Heidenreich, K., Hill, J. A., Hoyer-Hansen, M., Hu, X., Huang, W. P., Iwasaki, A., Jaattela, M., Jackson, W. T., Jiang, X., Jin, S., Johansen, T., Jung, J. U., Kadowaki, M., Kang, C., Kelekar, A., Kessel, D. H., Kiel, J. A., Kim, H. P., Kimchi, A., Kinsella, T. J., Kiselyov, K., Kitamoto, K., Knecht, E., Komatsu, M., Kominami, E., Kondo, S., Kovacs, A. L., Kroemer, G., Kuan, C. Y., Kumar, R., Kundu, M., Landry, J., Laporte, M., Le, W., Lei, H. Y., Lenardo, M. J., Levine, B., Lieberman, A., Lim, K. L., Lin, F. C., Liou, W., Liu, L.

F. Lopez-Berestein, G. Lopez-Otin, C. Lu, B. Macleod, K. F. Malorni, W. Martinet, W. Matsuoka, K. Mautner, J. Meijer, A. J. Melendez, A. Michels, P. Miotto, G. Mistiaen, W. P. Mizushima, N. Mograbi, B. Monastyrska, I. Moore, M. N. Moreira, P. I. Moriyasu, Y. Motyl, T. Munz, C. Murphy, L. O. Naqvi, N. I. Neufeld, T. P. Nishino, I. Nixon, R. A. Noda, T. Nurnberg, B. Ogawa, M. Oleinick, N. L. Olsen, L. J. Ozpolat, B. Paglin, S. Palmer, G. E. Papassideri, I. Parkes, M. Perlmutter, D. H. Perry, G. Piacentini, M. Pinkas-Kramarski, R. Prescott, M. Proikas-Cezanne, T. Raben, N. Rami, A. Reggiori, F. Rohrer, B. Rubinsztein, D. C. Ryan, K. M. Sadoshima, J. Sakagami, H. Sakai, Y. Sandri, M. Sasakawa, C. Sass, M. Schneider, C. Seglen, P. O. Seleverstov, O. Settleman, J. Shacka, J. J. Shapiro, I. M. Sibirny, A. Silva-Zacarin, E. C. Simon, H. U. Simone, C. Simonsen, A. Smith, M. A. Spanel-Borowski, K. Srinivas, V. Steeves, M. Stenmark, H. Stromhaug, P. E. Subauste, C. S. Sugimoto, S. Sulzer, D. Suzuki, T. Swanson, M. S. Tabas, I. Takeshita, F. Talbot, N. J. Talloczy, Z. Tanaka, K. Tanida, I. Taylor, G. S. Taylor, J. P. Terman, A. Tettamanti, G. Thompson, C. B. Thumm, M. Tolkovsky, A. M. Tooze, S. A. Truant, R. Tumanovska, L. V. Uchiyama, Y. Ueno, T. Uzcategui, N. L. van der Klei, I. Vaquero, E. C. Vellai, T. Vogel, M. W. Wang, H. G. Webster, P. Wiley, J. W. Xi, Z. Xiao, G. Yahalom, J. Yang, J. M. Yap, G. Yin, X. M. Yoshimori, T. Yu, L. Yue, Z. Yuzaki, M. Zahirnyk, O. Zheng, X. Zhu, X. and Deter, R. L. (2008). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* **4**, 151-75.

Klionsky, D. J., Cregg, J. M., Dunn, W. A., Jr., Emr, S. D., Sakai, Y., Sandoval, I. V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M. and Ohsumi, Y. (2003). A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell* **5**, 539-45.

Komatsu, M., Ueno, T., Waguri, S., Uchiyama, Y., Kominami, E. and Tanaka, K. (2007). Constitutive autophagy: vital role in clearance of unfavorable proteins in neurons. *Cell Death Differ* **14**, 887-94.

Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E. and Tanaka, K. (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* **441**, 880-4.

Koo, E. H. and Squazzo, S. L. (1994). Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *J Biol Chem* **269**, 17386-9.

Koprowski, H., Zheng, Y. M., Heber-Katz, E., Fraser, N., Rorke, L., Fu, Z. F., Hanlon, C. and Dietzschold, B. (1993). In vivo expression of inducible nitric oxide synthase in experimentally induced neurologic diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 3024-7.

Kountouras, J., Tsolaki, M., Gavalas, E., Boziki, M., Zavos, C., Karatzoglou, P., Chatzopoulos, D. and Venizelos, I. (2006). Relationship between *Helicobacter pylori* infection and Alzheimer disease. *Neurology* **66**, 938-40.

- Kuma, A., Matsui, M. and Mizushima, N.** (2007). LC3, an autophagosome marker, can be incorporated into protein aggregates independent of autophagy: caution in the interpretation of LC3 localization. *Autophagy* **3**, 323-8.
- Kurochkin, I. V. and Goto, S.** (1994). Alzheimer's beta-amyloid peptide specifically interacts with and is degraded by insulin degrading enzyme. *FEBS Lett* **345**, 33-7.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- LaFerla, F. M., Green, K. N. and Oddo, S.** (2007). Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* **8**, 499-509.
- Larsen, K. E. and Sulzer, D.** (2002). Autophagy in neurons: a review. *Histol Histopathol* **17**, 897-908.
- LaVail, J. H., Zhan, J. and Margolis, T. P.** (1990). HSV (type 1) infection of the trigeminal complex. *Brain Res* **514**, 181-8.
- LeBlanc, A. C., Xue, R. and Gambetti, P.** (1996). Amyloid precursor protein metabolism in primary cell cultures of neurons, astrocytes, and microglia. *J Neurochem* **66**, 2300-10.
- Lee, H. K. and Iwasaki, A.** (2008). Autophagy and antiviral immunity. *Curr Opin Immunol* **20**, 23-9.
- Lesne, S., Koh, M. T., Kotilinek, L., Kaye, R., Glabe, C. G., Yang, A., Gallagher, M. and Ashe, K. H.** (2006). A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* **440**, 352-7.
- Levine, B.** (2007). Cell biology: autophagy and cancer. *Nature* **446**, 745-7.
- Levine, B. and Klionsky, D. J.** (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* **6**, 463-77.
- Levine, B. and Kroemer, G.** (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* **132**, 27-42.
- Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D. M., Oshima, J., Pettingell, W. H., Yu, C. E., Jondro, P. D., Schmidt, S. D., Wang, K. and et al.** (1995). Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* **269**, 973-7.
- Lewis, J., Dickson, D. W., Lin, W. L., Chisholm, L., Corral, A., Jones, G., Yen, S. H., Sahara, N., Skipper, L., Yager, D., Eckman, C., Hardy, J., Hutton, M. and McGowan, E.** (2001). Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science* **293**, 1487-91.

- Leyssen, M., Ayaz, D., Hebert, S. S., Reeve, S., De Strooper, B. and Hassan, B. A.** (2005). Amyloid precursor protein promotes post-developmental neurite arborization in the *Drosophila* brain. *EMBO J* **24**, 2944-55.
- Li, M., Chen, L., Lee, D. H., Yu, L. C. and Zhang, Y.** (2007). The role of intracellular amyloid beta in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* **83**, 131-9.
- Lin, W. R., Wozniak, M. A., Cooper, R. J., Wilcock, G. K. and Itzhaki, R. F.** (2002). Herpesviruses in brain and Alzheimer's disease. *J Pathol* **197**, 395-402.
- Ling, D. and Salvaterra, P. M.** (2009). A central role for autophagy in Alzheimer-type neurodegeneration. *Autophagy* **5**, 738-40.
- Ling, D., Song, H. J., Garza, D., Neufeld, T. P. and Salvaterra, P. M.** (2009). Abeta42-induced neurodegeneration via an age-dependent autophagic-lysosomal injury in *Drosophila*. *PLoS One* **4**, e4201.
- Liou, W., Geuze, H. J., Geelen, M. J. and Slot, J. W.** (1997). The autophagic and endocytic pathways converge at the nascent autophagic vacuoles. *J Cell Biol* **136**, 61-70.
- Little, C. S., Hammond, C. J., MacIntyre, A., Balin, B. J. and Appelt, D. M.** (2004). Chlamydia pneumoniae induces Alzheimer-like amyloid plaques in brains of BALB/c mice. *Neurobiol Aging* **25**, 419-29.
- Long, M. C., Leong, V., Schaffer, P. A., Spencer, C. A. and Rice, S. A.** (1999). ICP22 and the UL13 protein kinase are both required for herpes simplex virus-induced modification of the large subunit of RNA polymerase II. *J Virol* **73**, 5593-604.
- Lopez-Guerrero, J. A. and Alonso, M. A.** (1997). Nitric oxide production induced by herpes simplex virus type 1 does not alter the course of the infection in human monocytic cells. *J Gen Virol* **78** (Pt 8), 1977-80.
- Lustbader, J. W., Cirilli, M., Lin, C., Xu, H. W., Takuma, K., Wang, N., Caspersen, C., Chen, X., Pollak, S., Chaney, M., Trinchese, F., Liu, S., Gunn-Moore, F., Lue, L. F., Walker, D. G., Kuppusamy, P., Zewier, Z. L., Arancio, O., Stern, D., Yan, S. S. and Wu, H.** (2004). ABAD directly links Abeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease. *Science* **304**, 448-52.
- Mamelak, M.** (2007). Alzheimer's disease, oxidative stress and gamma-hydroxybutyrate. *Neurobiol Aging* **28**, 1340-60.

- Mark, R. J., Pang, Z., Geddes, J. W., Uchida, K. and Mattson, M. P.** (1997). Amyloid beta-peptide impairs glucose transport in hippocampal and cortical neurons: involvement of membrane lipid peroxidation. *J Neurosci* **17**, 1046-54.
- Marques, C. A., Keil, U., Bonert, A., Steiner, B., Haass, C., Muller, W. E. and Eckert, A.** (2003). Neurotoxic mechanisms caused by the Alzheimer's disease-linked Swedish amyloid precursor protein mutation: oxidative stress, caspases, and the JNK pathway. *J Biol Chem* **278**, 28294-302.
- Marques, C. P., Cheeran, M. C., Palmquist, J. M., Hu, S. and Lokensgard, J. R.** (2008). Microglia are the major cellular source of inducible nitric oxide synthase during experimental herpes encephalitis. *J Neurovirol* **14**, 229-38.
- Martinez-Vicente, M. and Cuervo, A. M.** (2007). Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. *Lancet Neurol* **6**, 352-61.
- Martins, I. J., Berger, T., Sharman, M. J., Verdile, G., Fuller, S. J. and Martins, R. N.** (2009). Cholesterol metabolism and transport in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem* **111**, 1275-308.
- Masters, C. L. and Beyreuther, K.** (2006). Pathways to the discovery of the Abeta amyloid of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **9**, 155-61.
- Mattson, M. P., Gary, D. S., Chan, S. L. and Duan, W.** (2001). Perturbed endoplasmic reticulum function, synaptic apoptosis and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochem Soc Symp*, 151-62.
- McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D. and Stadlan, E. M.** (1984). Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* **34**, 939-44.
- Mellman, I.** (1996). Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**, 575-625.
- Meyding-Lamade, U., Haas, J., Lamade, W., Stingle, K., Kehm, R., Fath, A., Heinrich, K., Storch Hagenlocher, B. and Wildemann, B.** (1998). Herpes simplex virus encephalitis: long-term comparative study of viral load and the expression of immunologic nitric oxide synthase in mouse brain tissue. *Neurosci Lett* **244**, 9-12.
- Miklossy, J., Kasas, S., Janzer, R. C., Ardizzoni, F. and Van der Loos, H.** (1994). Further ultrastructural evidence that spirochaetes may play a role in the aetiology of Alzheimer's disease. *Neuroreport* **5**, 1201-4.

- Miklossy, J., Kis, A., Radenovic, A., Miller, L., Forro, L., Martins, R., Reiss, K., Darbinian, N., Darekar, P., Mihaly, L. and Khalili, K.** (2006). Beta-amyloid deposition and Alzheimer's type changes induced by *Borrelia spirochetes*. *Neurobiol Aging* **27**, 228-36.
- Milatovic, D., Zhang, Y., Olson, S. J., Montine, K. S., Roberts, L. J., 2nd, Morrow, J. D., Montine, T. J., Dermody, T. S. and Valyi-Nagy, T.** (2002). Herpes simplex virus type 1 encephalitis is associated with elevated levels of F2-isoprostanes and F4-neuroprostanes. *J Neurovirol* **8**, 295-305.
- Mileusnic, R., Lancashire, C. L., Johnston, A. N. and Rose, S. P.** (2000). APP is required during an early phase of memory formation. *Eur J Neurosci* **12**, 4487-95.
- Miranda-Saksena, M., Boadle, R. A., Aggarwal, A., Tijono, B., Rixon, F. J., Diefenbach, R. J. and Cunningham, A. L.** (2009). Herpes simplex virus utilizes the large secretory vesicle pathway for anterograde transport of tegument and envelope proteins and for viral exocytosis from growth cones of human fetal axons. *J Virol* **83**, 3187-99.
- Mizuguchi, M., Ikeda, K. and Kim, S. U.** (1992). Differential distribution of cellular forms of beta-amyloid precursor protein in murine glial cell cultures. *Brain Res* **584**, 219-25.
- Mizushima, N.** (2004). Methods for monitoring autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 2491-502.
- Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M. D., Klionsky, D. J., Ohsumi, M. and Ohsumi, Y.** (1998). A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* **395**, 395-8.
- Mizushima, N., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T.** (2002). Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct Funct* **27**, 421-9.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhi, T., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T.** (2001). Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol* **152**, 657-68.
- Mizushima, N. and Yoshimori, T.** (2007). How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* **3**, 542-5.
- Montgomery, R. I., Warner, M. S., Lum, B. J. and Spear, P. G.** (1996). Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* **87**, 427-36.
- Mori, I., Kimura, Y., Naiki, H., Matsubara, R., Takeuchi, T., Yokochi, T. and Nishiyama, Y.** (2004). Reactivation of HSV-1 in the brain of patients with familial Alzheimer's disease. *J Med Virol* **73**, 605-11.

Mueller-Stainer, S., Zhou, Y., Arai, H., Roberson, E. D., Sun, B., Chen, J., Wang, X., Yu, G., Esposito, L., Mucke, L. and Gan, L. (2006). Anti-amyloidogenic and neuroprotective functions of cathepsin B: implications for Alzheimer's disease. *Neuron* **51**, 703-14.

Nagele, R. G., D'Andrea, M. R., Anderson, W. J. and Wang, H. Y. (2002). Intracellular accumulation of beta-amyloid(1-42) in neurons is facilitated by the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease. *Neuroscience* **110**, 199-211.

Nakai, A., Yamaguchi, O., Takeda, T., Higuchi, Y., Hikoso, S., Taniike, M., Omiya, S., Mizote, I., Matsumura, Y., Asahi, M., Nishida, K., Hori, M., Mizushima, N. and Otsu, K. (2007). The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat Med* **13**, 619-24.

Newcomb, W. W., Juhas, R. M., Thomsen, D. R., Homa, F. L., Burch, A. D., Weller, S. K. and Brown, J. C. (2001). The UL6 gene product forms the portal for entry of DNA into the herpes simplex virus capsid. *J Virol* **75**, 10923-32.

Newcomb, W. W., Trus, B. L., Booy, F. P., Steven, A. C., Wall, J. S. and Brown, J. C. (1993). Structure of the herpes simplex virus capsid. Molecular composition of the pentons and the triplexes. *J Mol Biol* **232**, 499-511.

Nickel, W. and Rabouille, C. (2009). Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 148-55.

Nishimoto, I., Okamoto, T., Matsuura, Y., Takahashi, S., Murayama, Y. and Ogata, E. (1993). Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o). *Nature* **362**, 75-9.

Nixon, R. A. (2006). Autophagy in neurodegenerative disease: friend, foe or turncoat? *Trends Neurosci* **29**, 528-35.

Nixon, R. A. (2007). Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. *J Cell Sci* **120**, 4081-91.

Nixon, R. A., Wegiel, J., Kumar, A., Yu, W. H., Peterhoff, C., Cataldo, A. and Cuervo, A. M. (2005). Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol* **64**, 113-22.

Nunomura, A., Castellani, R. J., Zhu, X., Moreira, P. I., Perry, G. and Smith, M. A. (2006). Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **65**, 631-41.

- Nunomura, A., Perry, G., Aliev, G., Hirai, K., Takeda, A., Balraj, E. K., Jones, P. K., Ghanbari, H., Wataya, T., Shimohama, S., Chiba, S., Atwood, C. S., Petersen, R. B. and Smith, M. A.** (2001). Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **60**, 759-67.
- O'Hare, P.** (1993). The virion transactivator of herpes simplex virus. *Seminars in Virology* **4**.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M. P., Akbari, Y. and LaFerla, F. M.** (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* **39**, 409-21.
- Orvedahl, A., Alexander, D., Tallozy, Z., Sun, Q., Wei, Y., Zhang, W., Burns, D., Leib, D. A. and Levine, B.** (2007). HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein. *Cell Host Microbe* **1**, 23-35.
- Ouimet, C. C., Baerwald, K. D., Gandy, S. E. and Greengard, P.** (1994). Immunocytochemical localization of amyloid precursor protein in rat brain. *J Comp Neurol* **348**, 244-60.
- Palu, G., Biasolo, M. A., Sartor, G., Masotti, L., Papini, E., Floreani, M. and Palatini, P.** (1994). Effects of herpes simplex virus type 1 infection on the plasma membrane and related functions of HeLa S3 cells. *J Gen Virol* **75** (Pt 12), 3337-44.
- Paludan, C., Schmid, D., Landthaler, M., Vockerodt, M., Kube, D., Tuschl, T. and Munz, C.** (2005). Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science* **307**, 593-6.
- Pappolla, M. A., Omar, R. A., Kim, K. S. and Robakis, N. K.** (1992). Immunohistochemical evidence of oxidative [corrected] stress in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* **140**, 621-8.
- Pasinetti, G. M.** (1996). Inflammatory mechanisms in neurodegeneration and Alzheimer's disease: the role of the complement system. *Neurobiol Aging* **17**, 707-16.
- Pasternak, S. H., Bagshaw, R. D., Guiral, M., Zhang, S., Ackerley, C. A., Pak, B. J., Callahan, J. W. and Mahuran, D. J.** (2003). Presenilin-1, nicastrin, amyloid precursor protein, and gamma-secretase activity are co-localized in the lysosomal membrane. *J Biol Chem* **278**, 26687-94.
- Pearson, H. A. and Peers, C.** (2006). Physiological roles for amyloid beta peptides. *J Physiol* **575**, 5-10.
- Pickford, F., Masliah, E., Britschgi, M., Lucin, K., Narasimhan, R., Jaeger, P. A., Small, S., Spencer, B., Rockenstein, E., Levine, B. and Wyss-Coray, T.** (2008). The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice. *J Clin Invest* **118**, 2190-9.

Piper, R. C. and Katzmann, D. J. (2007). Biogenesis and function of multivesicular bodies. *Annu Rev Cell Dev Biol* **23**, 519-47.

Poirier, J., Davignon, J., Bouthillier, D., Kogan, S., Bertrand, P. and Gauthier, S. (1993). Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* **342**, 697-9.

Pratico, D. (2002). Alzheimer's disease and oxygen radicals: new insights. *Biochem Pharmacol* **63**, 563-7.

Price, D. L. and Sisodia, S. S. (1998). Mutant genes in familial Alzheimer's disease and transgenic models. *Annu Rev Neurosci* **21**, 479-505.

Priller, C., Bauer, T., Mitteregger, G., Krebs, B., Kretschmar, H. A. and Herms, J. (2006). Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J Neurosci* **26**, 7212-21.

Quinlan, M. P., Chen, L. B. and Knipe, D. M. (1984). The intranuclear location of a herpes simplex virus DNA-binding protein is determined by the status of viral DNA replication. *Cell* **36**, 857-68.

Rajendran, L., Honsho, M., Zahn, T. R., Keller, P., Geiger, K. D., Verkade, P. and Simons, K. (2006). Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 11172-7.

Ravikumar, B. and Rubinsztein, D. C. (2004). Can autophagy protect against neurodegeneration caused by aggregate-prone proteins? *Neuroreport* **15**, 2443-5.

Ravikumar, B., Vacher, C., Berger, Z., Davies, J. E., Luo, S., Oroz, L. G., Scaravilli, F., Easton, D. F., Duden, R., O'Kane, C. J. and Rubinsztein, D. C. (2004). Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet* **36**, 585-95.

Recuero, M., Serrano, E., Bullido, M. J. and Valdivieso, F. (2004). Abeta production as consequence of cellular death of a human neuroblastoma overexpressing APP. *FEBS Lett* **570**, 114-8.

Recuero, M., Vicente, M. C., Martinez-Garcia, A., Ramos, M. C., Carmona-Saez, P., Sastre, I., Aldudo, J., Vilella, E., Frank, A., Bullido, M. J. and Valdivieso, F. (2009). A free radical-generating system induces the cholesterol biosynthesis pathway: a role in Alzheimer's disease. *Aging Cell* **8**, 128-39.

Reggiori, F. and Klionsky, D. J. (2002). Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryot Cell* **1**, 11-21.

- Renvoize, E. B., Awad, I. O. and Hambling, M. H.** (1987). A sero-epidemiological study of conventional infectious agents in Alzheimer's disease. *Age Ageing* **16**, 311-4.
- Renvoize, E. B. and Hambling, M. H.** (1984). Cytomegalovirus infection and Alzheimer's disease. *Age Ageing* **13**, 205-9.
- Richard, F. and Amouyel, P.** (2001). Genetic susceptibility factors for Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol* **412**, 1-12.
- Rodriguez, J. D., Royall, D., Daum, L. T., Kagan-Hallet, K. and Chambers, J. P.** (2005). Amplification of Herpes simplex type 1 and Human Herpes type 5 viral DNA from formalin-fixed Alzheimer brain tissue. *Neurosci Lett* **390**, 37-41.
- Roizman, B.** (1990). Herpesviridae. In *Virology*. Vol 2. B.N. Fields, and D.M. Knipe, editors. Lippincott-Raven, Philadelphia. 1787-1841.
- Roizman, B.** (1996). Herpesviridae. In *Virology*. Vol 2. B.N. Fields, D.M. Knipe, and P.M. Howley, editors. Lippincott-Raven, Philadelphia. 2221-2230.
- Roses, A. D.** (1995). On the metabolism of apolipoprotein E and the Alzheimer diseases. *Exp Neurol* **132**, 149-56.
- Rubinsztein, D. C., DiFiglia, M., Heintz, N., Nixon, R. A., Qin, Z. H., Ravikumar, B., Stefanis, L. and Tolkovsky, A.** (2005). Autophagy and its possible roles in nervous system diseases, damage and repair. *Autophagy* **1**, 11-22.
- Runz, H., Rietdorf, J., Tomic, I., de Bernard, M., Beyreuther, K., Pepperkok, R. and Hartmann, T.** (2002). Inhibition of intracellular cholesterol transport alters presenilin localization and amyloid precursor protein processing in neuronal cells. *J Neurosci* **22**, 1679-89.
- Sabo, S. L., Ikin, A. F., Buxbaum, J. D. and Greengard, P.** (2001). The Alzheimer amyloid precursor protein (APP) and FE65, an APP-binding protein, regulate cell movement. *J Cell Biol* **153**, 1403-14.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T.** (1989). "Expression of Cloned Genes in Cultured Mammalian Cells". In *Molecular cloning. A laboratory manual*, (ed. N. C. Ford N., Fergurson M.), pp. 16.32-16.36: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Satoh, T., Arii, J., Suenaga, T., Wang, J., Kogure, A., Uehori, J., Arase, N., Shiratori, I., Tanaka, S., Kawaguchi, Y., Spear, P. G., Lanier, L. L. and Arase, H.** (2008). PILRalpha is a herpes simplex virus-1 entry coreceptor that associates with glycoprotein B. *Cell* **132**, 935-44.

Satpute-Krishnan, P., DeGiorgis, J. A. and Bearer, E. L. (2003). Fast anterograde transport of herpes simplex virus: role for the amyloid precursor protein of alzheimer's disease. *Aging Cell* **2**, 305-18.

Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D., George-Hyslop, P. H., Pericak-Vance, M. A., Joo, S. H., Rosi, B. L., Gusella, J. F., Crapper-MacLachlan, D. R., Alberts, M. J. and et al. (1993). Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* **43**, 1467-72.

Sawtell, N. M. and Thompson, R. L. (1992). Herpes simplex virus type 1 latency-associated transcription unit promotes anatomical site-dependent establishment and reactivation from latency. *J Virol* **66**, 2157-69.

Sciabica, K. S., Dai, Q. J. and Sandri-Goldin, R. M. (2003). ICP27 interacts with SRPK1 to mediate HSV splicing inhibition by altering SR protein phosphorylation. *EMBO J* **22**, 1608-19.

Schek, N. and Bachenheimer, S. L. (1985). Degradation of cellular mRNAs induced by a virion-associated factor during herpes simplex virus infection of Vero cells. *J Virol* **55**, 601-10.

Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T. D., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., Larson, E., Levy-Lahad, E., Viitanen, M., Peskind, E., Poorkaj, P., Schellenberg, G., Tanzi, R., Wasco, W., Lannfelt, L., Selkoe, D. and Younkin, S. (1996). Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* **2**, 864-70.

Schmechel, D. E., Goldgaber, D., Burkhart, D. S., Gilbert, J. R., Gajdusek, D. C. and Roses, A. D. (1988). Cellular localization of messenger RNA encoding amyloid-beta-protein in normal tissue and in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* **2**, 96-111.

Schmid, D., Dengjel, J., Schoor, O., Stevanovic, S. and Munz, C. (2006). Autophagy in innate and adaptive immunity against intracellular pathogens. *J Mol Med* **84**, 194-202.

Schubert, D., Jin, L. W., Saitoh, T. and Cole, G. (1989). The regulation of amyloid beta protein precursor secretion and its modulatory role in cell adhesion. *Neuron* **3**, 689-94.

Seglen, P. O. and Gordon, P. B. (1982). 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 1889-92.

Selkoe, D. J. (1991). The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* **6**, 487-98.

Selkoe, D. J. (1997). Alzheimer's disease: genotypes, phenotypes, and treatments. *Science* **275**, 630-1.

- Selkoe, D. J.** (2001). Clearing the brain's amyloid cobwebs. *Neuron* **32**, 177-80.
- Sequiera, L. W., Jennings, L. C., Carrasco, L. H., Lord, M. A., Curry, A. and Sutton, R. N.** (1979). Detection of herpes-simplex viral genome in brain tissue. *Lancet* **2**, 609-12.
- Shearman, M. S., Ragan, C. I. and Iversen, L. L.** (1994). Inhibition of PC12 cell redox activity is a specific, early indicator of the mechanism of beta-amyloid-mediated cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1470-4.
- Shen, W., Sa e Silva, M., Jaber, T., Vitvitskaia, O., Li, S., Henderson, G. and Jones, C.** (2009). Two small RNAs encoded within the first 1.5 kilobases of the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript can inhibit productive infection and cooperate to inhibit apoptosis. *J Virol* **83**, 9131-9.
- Sherrington, R., Rogaev, E. I., Liang, Y., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K. and et al.** (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* **375**, 754-60.
- Shintani, T. and Klionsky, D. J.** (2004). Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* **306**, 990-5.
- Shoji-Kawata, S. and Levine, B.** (2009). Autophagy, antiviral immunity, and viral countermeasures. *Biochim Biophys Acta*.
- Shukla, D., Liu, J., Blaiklock, P., Shworak, N. W., Bai, X., Esko, J. D., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., Rosenberg, R. D. and Spear, P. G.** (1999). A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell* **99**, 13-22.
- Shulman, R. G., Rothman, D. L., Behar, K. L. and Hyder, F.** (2004). Energetic basis of brain activity: implications for neuroimaging. *Trends Neurosci* **27**, 489-95.
- Sir, D., Chen, W. L., Choi, J., Wakita, T., Yen, T. S. and Ou, J. H.** (2008). Induction of incomplete autophagic response by hepatitis C virus via the unfolded protein response. *Hepatology* **48**, 1054-61.
- Sisodia, S. S.** (1992). Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6075-9.
- Small, D. H., Mok, S. S. and Bornstein, J. C.** (2001). Alzheimer's disease and Abeta toxicity: from top to bottom. *Nat Rev Neurosci* **2**, 595-8.
- Smith, M. A., Rottkamp, C. A., Nunomura, A., Raina, A. K. and Perry, G.** (2000). Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* **1502**, 139-44.

Snyder, E. M., Nong, Y., Almeida, C. G., Paul, S., Moran, T., Choi, E. Y., Nairn, A. C., Salter, M. W., Lombroso, P. J., Gouras, G. K. and Greengard, P. (2005). Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci* **8**, 1051-8.

Soba, P., Eggert, S., Wagner, K., Zentgraf, H., Siehl, K., Kreger, S., Lower, A., Langer, A., Merdes, G., Paro, R., Masters, C. L., Muller, U., Kins, S. and Beyreuther, K. (2005). Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *EMBO J* **24**, 3624-34.

Spear, P. G. (2004). Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. *Cell Microbiol* **6**, 401-10.

Spear, P. G., Eisenberg, R. J. and Cohen, G. H. (2000). Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry. *Virology* **275**, 1-8.

Steiner, I. and Kennedy, P. G. (1995). Herpes simplex virus latent infection in the nervous system. *J Neurovirol* **1**, 19-29.

Stevens, J. G., Wagner, E. K., Devi-Rao, G. B., Cook, M. L. and Feldman, L. T. (1987). RNA complementary to a herpesvirus alpha gene mRNA is prominent in latently infected neurons. *Science* **235**, 1056-9.

Stoorvogel, W., Kleijmeer, M. J., Geuze, H. J. and Raposo, G. (2002). The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic* **3**, 321-30.

Su, B., Wang, X., Nunomura, A., Moreira, P. I., Lee, H. G., Perry, G., Smith, M. A. and Zhu, X. (2008). Oxidative stress signaling in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* **5**, 525-32.

Tagawa, K., Maruyama, K. and Ishiura, S. (1992). Amyloid beta/A4 precursor protein (APP) processing in lysosomes. *Ann N Y Acad Sci* **674**, 129-37.

Takahashi, R. H., Almeida, C. G., Kearney, P. F., Yu, F., Lin, M. T., Milner, T. A. and Gouras, G. K. (2004). Oligomerization of Alzheimer's beta-amyloid within processes and synapses of cultured neurons and brain. *J Neurosci* **24**, 3592-9.

Takahashi, R. H., Milner, T. A., Li, F., Nam, E. E., Edgar, M. A., Yamaguchi, H., Beal, M. F., Xu, H., Greengard, P. and Gouras, G. K. (2002). Intraneuronal Alzheimer abeta42 accumulates in multivesicular bodies and is associated with synaptic pathology. *Am J Pathol* **161**, 1869-79.

Talloczy, Z., Jiang, W., Virgin, H. W. t., Leib, D. A., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Eskelinen, E. L. and Levine, B. (2002). Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2alpha kinase signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 190-5.

Talloczy, Z., Virgin, H. W. t. and Levine, B. (2006). PKR-dependent autophagic degradation of herpes simplex virus type 1. *Autophagy* **2**, 24-9.

Tanaka, S., Shiojiri, S., Takahashi, Y., Kitaguchi, N., Ito, H., Kameyama, M., Kimura, J., Nakamura, S. and Ueda, K. (1989). Tissue-specific expression of three types of beta-protein precursor mRNA: enhancement of protease inhibitor-harboring types in Alzheimer's disease brain. *Biochem Biophys Res Commun* **165**, 1406-14.

Taylor, M. P. and Kirkegaard, K. (2008). Potential subversion of autophagosomal pathway by picornaviruses. *Autophagy* **4**, 286-9.

Thumm, M., Egner, R., Koch, B., Schlumpberger, M., Straub, M., Veenhuis, M. and Wolf, D. H. (1994). Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **349**, 275-80.

Tomazin, R., Hill, A. B., Jugovic, P., York, I., van Endert, P., Ploegh, H. L., Andrews, D. W. and Johnson, D. C. (1996). Stable binding of the herpes simplex virus ICP47 protein to the peptide binding site of TAP. *EMBO J* **15**, 3256-66.

Trapp, B. D. and Hauer, P. E. (1994). Amyloid precursor protein is enriched in radial glia: implications for neuronal development. *J Neurosci Res* **37**, 538-50.

Trojanowski, J. Q., Schmidt, M. L., Shin, R. W., Bramblett, G. T., Rao, D. and Lee, V. M. (1993). Altered tau and neurofilament proteins in neuro-degenerative diseases: diagnostic implications for Alzheimer's disease and Lewy body dementias. *Brain Pathol* **3**, 45-54.

Tsukada, M. and Ohsumi, Y. (1993). Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **333**, 169-74.

Valyi-Nagy, T. and Dermody, T. S. (2005). Role of oxidative damage in the pathogenesis of viral infections of the nervous system. *Histol Histopathol* **20**, 957-67.

Valyi-Nagy, T., Olson, S. J., Valyi-Nagy, K., Montine, T. J. and Dermody, T. S. (2000). Herpes simplex virus type 1 latency in the murine nervous system is associated with oxidative damage to neurons. *Virology* **278**, 309-21.

van der Goot, F. G. and Gruenberg, J. (2006). Intra-endosomal membrane traffic. *Trends Cell Biol* **16**, 514-21.

Varadarajan, S., Yatin, S., Aksenova, M. and Butterfield, D. A. (2000). Review: Alzheimer's amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity. *J Struct Biol* **130**, 184-208.

Vassar, R. (2001). The beta-secretase, BACE: a prime drug target for Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* **17**, 157-70.

Vassar, R. (2004). BACE1: the beta-secretase enzyme in Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* **23**, 105-14.

von Arnim, C. A., Spoelgen, R., Peltan, I. D., Deng, M., Courchesne, S., Koker, M., Matsui, T., Kowa, H., Lichtenthaler, S. F., Irizarry, M. C. and Hyman, B. T. (2006). GGA1 acts as a spatial switch altering amyloid precursor protein trafficking and processing. *J Neurosci* **26**, 9913-22.

Walsh, D. M., Tseng, B. P., Rydel, R. E., Podlisny, M. B. and Selkoe, D. J. (2000). The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain. *Biochemistry* **39**, 10831-9.

Wang, Q. J., Ding, Y., Kohtz, D. S., Mizushima, N., Cristea, I. M., Rout, M. P., Chait, B. T., Zhong, Y., Heintz, N. and Yue, Z. (2006). Induction of autophagy in axonal dystrophy and degeneration. *J Neurosci* **26**, 8057-68.

Warner, M. S., Geraghty, R. J., Martinez, W. M., Montgomery, R. I., Whitbeck, J. C., Xu, R., Eisenberg, R. J., Cohen, G. H. and Spear, P. G. (1998). A cell surface protein with herpesvirus entry activity (HveB) confers susceptibility to infection by mutants of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2, and pseudorabies virus. *Virology* **246**, 179-89.

Weidemann, A., Konig, G., Bunke, D., Fischer, P., Salbaum, J. M., Masters, C. L. and Beyreuther, K. (1989). Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* **57**, 115-26.

Weir, J. P. (2001). Regulation of herpes simplex virus gene expression. *Gene* **271**, 117-30.

White, A. R., Zheng, H., Galatis, D., Maher, F., Hesse, L., Multhaup, G., Beyreuther, K., Masters, C. L. and Cappai, R. (1998). Survival of cultured neurons from amyloid precursor protein knock-out mice against Alzheimer's amyloid-beta toxicity and oxidative stress. *J Neurosci* **18**, 6207-17.

Wild-Bode, C., Yamazaki, T., Capell, A., Leimer, U., Steiner, H., Ihara, Y. and Haass, C. (1997). Intracellular generation and accumulation of amyloid beta-peptide terminating at amino acid 42. *J Biol Chem* **272**, 16085-8.

- Wong, J., Zhang, J., Si, X., Gao, G., Mao, I., McManus, B. M. and Luo, H. (2008).** Autophagosome supports coxsackievirus B3 replication in host cells. *J Virol* **82**, 9143-53.
- Wozniak, M. A., Frost, A. L. and Itzhaki, R. F. (2009a).** Alzheimer's disease-specific tau phosphorylation is induced by herpes simplex virus type 1. *J Alzheimers Dis* **16**, 341-50.
- Wozniak, M. A., Itzhaki, R. F., Shipley, S. J. and Dobson, C. B. (2007).** Herpes simplex virus infection causes cellular beta-amyloid accumulation and secretase upregulation. *Neurosci Lett* **429**, 95-100.
- Wozniak, M. A., Mee, A. P. and Itzhaki, R. F. (2009b).** Herpes simplex virus type 1 DNA is located within Alzheimer's disease amyloid plaques. *J Pathol* **217**, 131-8.
- Wozniak, M. A., Shipley, S. J., Combrinck, M., Wilcock, G. K. and Itzhaki, R. F. (2005).** Productive herpes simplex virus in brain of elderly normal subjects and Alzheimer's disease patients. *J Med Virol* **75**, 300-6.
- Xu, H., Greengard, P. and Gandy, S. (1995).** Regulated formation of Golgi secretory vesicles containing Alzheimer beta-amyloid precursor protein. *J Biol Chem* **270**, 23243-5.
- Xu, J., Chen, S., Ahmed, S. H., Chen, H., Ku, G., Goldberg, M. P. and Hsu, C. Y. (2001).** Amyloid-beta peptides are cytotoxic to oligodendrocytes. *J Neurosci* **21**, RC118.
- Yamazaki, T., Chang, T. Y., Haass, C. and Ihara, Y. (2001).** Accumulation and aggregation of amyloid beta-protein in late endosomes of Niemann-pick type C cells. *J Biol Chem* **276**, 4454-60.
- Yan, S. D., Chen, X., Fu, J., Chen, M., Zhu, H., Roher, A., Slattery, T., Zhao, L., Nagashima, M., Morser, J., Migheli, A., Nawroth, P., Stern, D. and Schmidt, A. M. (1996).** RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* **382**, 685-91.
- Ye, G. J., Vaughan, K. T., Vallee, R. B. and Roizman, B. (2000).** The herpes simplex virus 1 U(L)34 protein interacts with a cytoplasmic dynein intermediate chain and targets nuclear membrane. *J Virol* **74**, 1355-63.
- Yu, L., Alva, A., Su, H., Dutt, P., Freundt, E., Welsh, S., Baehrecke, E. H. and Lenardo, M. J. (2004a).** Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science* **304**, 1500-2.

Yu, W. H., Cuervo, A. M., Kumar, A., Peterhoff, C. M., Schmidt, S. D., Lee, J. H., Mohan, P. S., Mercken, M., Farmery, M. R., Tjernberg, L. O., Jiang, Y., Duff, K., Uchiyama, Y., Naslund, J., Mathews, P. M., Cataldo, A. M. and Nixon, R. A. (2005). Macroautophagy--a novel Beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *J Cell Biol* **171**, 87-98.

Yu, W. H., Kumar, A., Peterhoff, C., Shapiro Kulnane, L., Uchiyama, Y., Lamb, B. T., Cuervo, A. M. and Nixon, R. A. (2004b). Autophagic vacuoles are enriched in amyloid precursor protein-secretase activities: implications for beta-amyloid peptide over-production and localization in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 2531-40.

Zambrano, A., Solis, L., Salvadores, N., Cortes, M., Lerchundi, R. and Otth, C. (2008). Neuronal cytoskeletal dynamic modification and neurodegeneration induced by infection with herpes simplex virus type 1. *J Alzheimers Dis* **14**, 259-69.

Zemlan, F. P., Thienhaus, O. J. and Bosmann, H. B. (1989). Superoxide dismutase activity in Alzheimer's disease: possible mechanism for paired helical filament formation. *Brain Res* **476**, 160-2.

Zheng, H., Jiang, M., Trumbauer, M. E., Hopkins, R., Sirinathsinghji, D. J., Stevens, K. A., Conner, M. W., Slunt, H. H., Sisodia, S. S., Chen, H. Y. and Van der Ploeg, L. H. (1996). Mice deficient for the amyloid precursor protein gene. *Ann N Y Acad Sci* **777**, 421-6.

Zheng, L., Roberg, K., Jerhammar, F., Marcusson, J. and Terman, A. (2006). Oxidative stress induces intralysosomal accumulation of Alzheimer amyloid beta-protein in cultured neuroblastoma cells. *Ann N Y Acad Sci* **1067**, 248-51.

Zheng, W. H., Bastianetto, S., Mennicken, F., Ma, W. and Kar, S. (2002). Amyloid beta peptide induces tau phosphorylation and loss of cholinergic neurons in rat primary septal cultures. *Neuroscience* **115**, 201-11.

Zhu, X., Raina, A. K., Lee, H. G., Casadesus, G., Smith, M. A. and Perry, G. (2004). Oxidative stress signalling in Alzheimer's disease. *Brain Res* **1000**, 32-9.

